

Estudo do efeito da brassagem no perfil do mosto de uma cerveja Weiss

Baltasar Strobl Jusek Calapez Garcia

Dissertação para obtenção do Grau Mestre em
Engenharia alimentar

Orientador: Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista

Júri:

Presidente: Doutor Vitor Manuel Delgado Alves, Professora Auxiliar, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com Agregação, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

Para a realização deste trabalho, tive a oportunidade de conhecer pessoas que me ajudaram bastante, tornando esta dissertação exequível.

Quero desde já agradecer à professora Catarina Prista pela disponibilidade, apoio prestado e compreensão em relação à minha situação enquanto estive a fazer a tese.

Agradeço às meninas do laboratório, Rafaela Santo, Nádia Figueiredo e Ana Patrícia, não só pelo auxílio prestado no laboratório, como também pela amizade.

Um especial agradecimento à minha namorada Marta Antunes Gonçalves pela motivação e apoio, não só neste trabalho como também para a minha fase seguinte.

Ao meu pai, um especial agradecimento pela paciência e sermões. Não foi uma fase fácil, mas já está ultrapassada. És um grande exemplo de sucesso e de inspiração. Muito obrigado por teres sido pai, patrão e líder.

Claro que não falta o agradecimento à minha mãe. Agradeço-te muito pelas batalhas que enfrentou às minhas custas.

Zu dir Oma, vielen Dank für deine Tapferkeit, Liebe und Motivation. Du bist immer für mich da und hast alles mit mir mitgemacht. „Wir beide du und ich!“

Deixo também um especial agradecimento aos meus irmãos, António e Bernardo. Bernardo muito obrigado por seres um dos meus mentores. Um dia ainda havemos de fazer um hotel *four seasons*.

Não quero deixar de agradecer à minha família pela constante companhia e apoio prestado durante este percurso.

Agradeço aos meus amigos e colegas do ISA pelo companheirismo e amizade ao longo destes anos de faculdade. Melhores tempos da minha vida!

Por fim, quero agradecer ao Rafael Zundt, Dario Dirks, Eduardo Tavares e Giulio Celentano amigos de longa data que sempre me incentivaram a seguir os meus objetivos.

Resumo

A cerveja é definida na Portaria 1/96 de 3 de Janeiro como: “A bebida obtida por fermentação alcoólica, mediante leveduras selecionadas do género *Sacharomyces*, de um mosto preparado a partir de malte de cereais, principalmente cevada, e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, ao qual foram adicionadas flores de lúpulo ou seus derivados e água potável” [1].

A produção de cerveja foi sofrendo várias alterações tecnológicas, sensoriais e nutricionais, hoje em dia é preparada com recurso a várias operações unitárias. Uma destas operações unitárias é a brassagem, que consiste no aumento temperatura do mosto de acordo com a temperatura ótima de funcionamento das enzimas a fim de converter o amido em açúcares fermentescíveis.

O objetivo desta dissertação foi comparar a influência de diferentes modelos de brassagem numa cerveja *weiss* dando especial atenção à influência das enzimas alfa-amilase e beta-amilase. Foram efetuadas onze brassagens e retiradas catorze amostras ao longo das brassagens. Determinaram-se vários parâmetros físico-químicos: pH, densidade, proteína total, turvação e atividade amilolítica bem como as concentrações de amido, açúcares e ácidos orgânicos (por HPLC).

Através dos ensaios experimentais, foi possível concluir que não existe uma grande variação nos parâmetros de pH (entre 5,8 e 5,6), densidade (entre 1,051 e 1,055), proteína total e turvação entre os diferentes modelos de brassagem. No entanto, houve variação no teor de açúcares, verificando-se que a brassagem com um patamar mais longo a temperaturas ótimas da α -amilase tem maior teor de maltose (4,3% (p/v)) não se observando variações na concentração de glucose. Estes resultados são consentâneos com a redução do teor em amido de 25% para 20% entre a brassagem com um patamar mais curto e a brassagem com um patamar mais longo a temperaturas ótimas da α -amilase. Assim, verificou-se que alterando o perfil de brassagem é possível alterar o perfil do mosto a fermentar.

Palavras-chave: brassagem, perfil do mosto, atividade enzimática, açúcares fermentescíveis, amido.

Abstract

Beer is defined in Ordinance 1/96 from 3rd of January of the Portuguese Law as: "The beverage obtained by alcoholic fermentation through selected yeasts of the genus *Sacharomyces* from a wort prepared from cereal malt, mainly barley, and other amylaceous or sugary raw materials, in which hop flowers, or their derivatives, and potable water have been added " [1].

Over the years, the beer production process has undergone several technological, sensory and nutritional changes and nowadays beer is prepared with the undergoing of several unit operations. One of these is the mashing, which has the function of heating the wort at specific temperatures to subject the functioning of the enzymes which in turn converted the starch into fermentable sugar.

The goal of this dissertation was to compare the influence of different mashing models of a weiss beer, having a special attention in the influence of the alfa-amylase and beta-amylase. For this, eleven beers were produced, and fourteen samples were collected over the mashing period. The physical-chemical parameter, these are, pH, density, total protein, turbidity and amylolytic activity, were determined as well as the concentration of starch, sugars and organic acids (with HPLC).

With the conducted experimental trials, it can be concluded that there isn't a big variation in the pH (between 5,8 and 5,6), density (between 1,051 and 1,055), total protein, and turbidity parameters between each mashing model. However, there was a variation in the sugar content, as the mashing wort which has undergone the most time in optimal temperatures for alfa-amylase activity has a higher content of maltose (4,3% (p/v)) and no variation of the glucose concentration. These results are coherent with the reduction of the starch concentration from 25% to 20% between the mashing wort with longer periods and shorter periods in optimal temperatures for alfa-amylase activity. Thus, it is possible to modify the characteristics of a wort in fermentation with different mashing models.

Keywords: mashing; wort perfil; enzymatic activity; fermentable sugars; starch.

Índice Geral

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Índice Geral.....	v
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas	viii
1 Introdução.....	1
2 Enquadramento Teórico.....	2
2.1 História.....	2
2.1.1 História da cerveja.....	2
2.1.2 Tipos de Cerveja	6
2.2 Matérias Primas da Cerveja	10
2.2.1 Água	11
2.2.2 Grãos maltados e não maltados	14
2.2.3 Lúpulo.....	16
2.2.4 Levedura	17
2.3 Processo de Produção de Cerveja	18
2.3.1 Maltagem.....	19
2.3.2 Moagem	20
2.3.3 Brassagem	20
2.3.4 Filtração.....	22
2.3.5 Ebulição.....	22
2.3.6 Sedimentação (<i>turb removal</i>)	23
2.3.7 Refrigeração do mosto	23
2.3.8 Fermentação	24
2.3.9 Maturação	25
2.3.10 Clarificação	25
2.3.11 Engarrafamento e Armazenamento	26
2.4 Enzimas.....	26
2.4.1 Fitase.....	27
2.4.2 β Glucanase	28
2.4.3 Proteases e Peptidases	28
2.4.4 β -amilase	28

2.4.5	α -Amilase	29
2.5	Objectivos do trabalho	29
3	<i>Materiais e Métodos</i>	30
3.1	Formulação e Modelo de produção de cerveja	30
3.1.1	Formulação do mosto	30
3.1.2	Produção do mosto	30
3.2	Amostragem	32
3.3	Análises dos parâmetros físicos e químicos durante a brassagem	33
3.3.1	Determinação do pH	34
3.3.2	Determinação da densidade e massa volúmica	34
3.3.3	Determinação da proteína	34
3.3.4	Determinação da turvação	35
3.3.5	Determinação da atividade amilolítica	35
3.3.6	Determinação dos açúcares, etanol, glucose e ácidos orgânicos (HPLC)	36
4	<i>Resultados e discussão</i>	38
4.1	Caracterização físico-química do mosto durante a brassagem	38
4.1.1	Variação do pH	38
4.1.2	Variação da densidade	40
4.1.3	Determinação da Proteína total	43
4.1.4	Determinação da Turvação	45
4.2	Caracterização do perfil do mosto em relação aos açúcares e amido após a brassagem	46
4.2.1	Variação dos açúcares, glucose e ácidos orgânicos (HPLC)	46
4.2.2	Variação da Concentração média de amido	49
5	<i>Conclusões Gerais e Perspetivas Futuras</i>	52
6	<i>Bibliografia</i>	54
7	<i>Anexos</i>	58
	Anexo I – Retas de Calibração de HPLC	58
	Anexo II – Reta de Calibração da Proteína	59
	Anexo III – Reta de Calibração do Amido	60
	Anexo IV – Resultados obtidos nos ensaios experimentais	61

Índice de Figuras

Figura 1 - Etapas da produção de cerveja [2], [15]	19
Figura 2 - Composição do amido: amilose e amilopectina. [31].....	22
Figura 3 - Serpentina aço inox	31
Figura 4 - Speidel Braumeister 20L.....	31
Figura 5 - Modelo de brassagem com os pontos de recolha de cada amostra (em vermelho)	33
Figura 6 – Valores de pH em cada amostra por mosto.....	39
Figura 7- Valores de pH em cada mosto por amostras.....	40
Figura 8- Densidade em cada mosto por cada amostras	41
Figura 9- Densidade em cada amostra por cada mosto	42
Figura 10– Massa volúmica em g/mL em cada mosto por cada amostras	43
Figura 11 – Massa volúmica em g/mL em cada amostra por cada mosto.....	43
Figura 12 - <i>Proteína total solúvel (em ug/mL)em cada mosto por cada amostras....</i>	44
Figura 13 - Proteína total solúvel (em ug/mL) em cada amostra por cada mosto	45
Figura 14 - Medições da turvação em cada amostra por cada mosto	46
Figura 15 – Medições da turvação em cada mosto por cada amostras.....	Error!
Bookmark not defined.	
Figura 16 - Concentrações (em g/L) de maltotriose, maltose, glucose e frutose para o mosto modelo, β -amilase - e β -amilase +	47
Figura 17 - Concentrações (g/L) de maltotriose, maltose, glucose e frutose para o mosto modelo, α -amilase - e α -amilase +	48
Figura 18 - Concentrações (em g/L) obtidas de maltotriose, maltose, glucose e frutose obtidas em cada mosto	48
Figura 19 – Concentrações de amido na amostra 12 em cada brassagem (em g/100 mL)	50
Figura 20 – Concentrações de Amido nas brassagens "Modelo", " α -amilase+" e " α -amilase–" (em g/100mL)	50
Figura 21 - Atividade nas brassagens Modelo, α -amilase - e α -amilase + (em mmol/min).....	51
Figura 22 – Curvas de Calibração de HPLC, dos diferentes açúcares – Maltotriose (A), Glucose (B), Maltose (C) e Frutose (D).....	58
Figura 23 - Curvas de Calibração da Proteína	59

Figura 24 - Curva de Calibração do Amido	60
--	----

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Diferentes variáveis para a classificar uma cerveja [2]	8
Tabela 2 - Atividade das enzimas na brassagem (Limites de temperaturas de funcionamento de cada enzima com a sua respetiva temperatura ótima) [37]	27
Tabela 3 - Modelo de Brassagem das diferentes cervejas confeccionadas durante a dissertação	32
Tabela 4 - Tempos de recolha das amostras	33
Tabela 5 - Tempos de recolha para determinação da concentração de amido em cada amostra para cada brassagem analisada	36
Tabela 6 – Concentrações de açúcares obtidas por HPLC (em mg/100 mL)	61
Tabela 7 - Concentração média de amido	61
Tabela 8 - Concentração média de amido para o mosto “Modelo”, "alfa-amilase -" e "alfa-amilase +" em g/100mL	62
Tabela 9 - Atividade amilolítica aos 63°C (em mmol/min)	62
Tabela 10 – Valores de pH obtidos para as várias amostras recolhidas ao longo das brassagens	63
Tabela 11 - massa optica do mosto	64
Tabela 12 – Valores de densidade obtidos para as várias amostras recolhidas ao longo das brassagens	65
Tabela 13 – Valores de proteína total do mosto (em µg/mL) obtidos para as várias amostras recolhidas ao longo das brassagens	66
Tabela 14 – Valores de turvação do mosto (em Abs) obtidos para as várias amostras recolhidas ao longo das brassagens	67

1 Introdução

O consumo de cerveja em Portugal, nomeadamente de cerveja artesanal, tem vindo crescer nos últimos anos. A abertura de novas cervejarias está a aumentar e cada cervejaria produz cervejas com características únicas. Com a utilização de diferentes métodos e matérias-primas, um cervejeiro tem a capacidade de criar novas cervejas distintas.

A cerveja é a bebida mais antiga do mundo, e os primeiros produtores tinham limitações nos recursos para poder diferenciar as suas cervejas. Estas ainda se agravaram mais na Alemanha, quando em 1516 foi implementada a lei da pureza alemã, que limitava os produtores a utilizarem somente malte, lúpulo e água. Deste modo a única forma de poderem diferenciar a cerveja era na utilização de diferentes tipos de malte, lúpulo e água. No entanto outra forma é através de alterações no modo de produção da cerveja, nomeadamente na brassagem.

Este trabalho teve como objetivo comparar a influência de diferentes modelos de brassagem numa cerveja *weiss*. Todos os modelos têm os mesmos patamares de temperaturas, o que varia é o tempo em cada temperatura. Cada temperatura reflete a temperatura ótima de uma determinada enzima, sendo assim possível observar a atividade e influência que as mesmas têm nas propriedades da cerveja. As propriedades foram avaliadas através de ensaios experimentais a nível físico e químico.

2 Enquadramento Teórico

2.1 História

A cerveja era um produto caseiro ou de pequena escala que era essencial na dieta da população que dependia da agricultura [2]. Embora só recentemente tenha ganho expressividade, a mesma existe desde o período neolítico [3]. A cerveja era apreciada pelos consumidores devido às suas propriedades intrínsecas, no entanto também pela sua ligação à religião, culinárias e éticas [2]. A história da cerveja não se baseia só nos avanços tecnológicos da indústria para o melhoramento dos processos na produção da mesma, pois também se tem de ter em conta a história das próprias pessoas[2], [3].

2.1.1 História da cerveja

A cerveja é considerada a bebida fermentada mais antiga do mundo, visto que os primeiros indícios da mesma foram descobertos em artefactos históricos, que indicam a presença de cerveja na Mesopotâmia à 6000-7000 anos [2]–[5]. No Egito, vestígios da cerveja da era pré dinastia (5510 – 3100 AC) foram encontrados em cemitérios em Naqada [4]. Também foram encontrados manuscritos da era pós dinastia referindo que a cerveja era uma bebida importante para a população egípcia deste período [4]. Estes produziam a cerveja a partir de Sorum e histórias constam que esta bebida foi introduzida pelo deus Osíris [4]. Outra referência da cerveja foi encontrada nas paredes das antigas pirâmides, na qual indicam que a cerveja era usada como oferta divina e oferta funerária [2], [4].

Outros textos históricos como o poema *Hymn to Ninkasi* do ano 1800 AC descreviam o processo de produção da cerveja no período da babilónia [3], [4]. Pode-se também ler neste poema os ingredientes utilizados para a produção de cerveja, estes são, as ervas aromáticas *bappier*, um cereal chamado *manu* e grãos de *titab* [3], [4].

Quando os gregos chegaram ao Egito em 331 AC estabeleceram a dinastia Ptolomeu [3]. Os líderes ptolemaicos introduziram a produção do vinho no Egito e esta bebida tornou-se muito popular [3]. Todavia, a cerveja começou a ser regulada e criaram-se impostos, com o pretexto de reduzir o do estado alcoolizado da população [3]. O desinteresse dos gregos pela cerveja é devido ao desejo de diferenciação dos homens sábios e cultos, que bebem vinho, com os bávaros, que bebem cerveja [3], [5]. Todavia, também existem razões filosófica, pois estes acreditavam na teoria dos 4 elementos do universo: quente, frio, húmido e seco [3], [5]. Nisto, os mesmos assumiram que o vinho era uma bebida quente que por sua vez tinha

uma conotação máscula, enquanto que a cerveja era uma bebida fria com conotação fêmea [3], [5].

Os romanos tomaram o preconceito da cerveja dos gregos e atribuíam este modelo de visão aos países vizinhos como a Britânia e a Alemanha [5]. No entanto deixou-se de ver a cerveja desta forma quando começaram as invasões romanas, pois não era possível praticar a vinicultura nos países do Norte e assim cerveja tornou-se um produto desejado pelas legiões [3], [4]. Ruínas de antigas cervejarias romanas podem ser encontradas em Regensburg, Alemanha, nas quais é possível constatar que a produção de cerveja foi praticada com elevado profissionalismo [3].

Após a queda do império romano, os mosteiros preservaram o conhecimento medicinal, técnico e científico dos romanos. Os mosteiros nórdicos tornaram-se no centro de produção da cerveja. Por exemplo o mosteiro carolíngio criou três cervejarias: uma para os nobres, outra para os monges e outra para os peregrinos. Nesta altura, os grãos maltados e não maltados eram esmagados por uma roda de pedra induzida por um moinho. As cervejarias consistiam de uma sala central de aquecimento e, ao lado, uma sala de arrefecimento e filtração da cerveja. A cave do edifício tinha 14 barris de fermentação com capacidade de 320 hL.[3]

No entanto, foi no norte de Europa durante o século X que a produção de cerveja se desenvolveu, quando os alemães começaram a introduzir lúpulo à cerveja [2], [3]. Este hábito propagou-se, retirando o uso de outras plantas e ervas, visto que o lúpulo concede um aroma agradável à cerveja, e também tem uma ação protetora contra os micróbios que eram desconhecidos [2]. Apesar da necessidade de novos equipamento e aumento da complexidade do processo com a introdução desta matéria prima, os cervejeiros tinham a capacidade de produzir uma cerveja com menor teor de álcool e em maiores quantidades, pois utilizavam as mesmas quantidades de grãos maltados e/ou não maltados [2]. A planta começou a ser plantada à volta das cidades [3]. Este novo ingrediente só foi introduzido na Inglaterra no século XV e nos estados Unidos foi só no século XVII [2].

Durante esta era, existiam dois tipos de cerveja: a cerveja, que tinha lúpulo, e a *A/e*, que não continha lúpulo [2]. No século XVI, alguns produtores de *A/e* começaram a introduzir lúpulo nas suas cervejas, no entanto em quantidades mais reduzidas [2]. Portanto, a *A/e* era uma cerveja doce, pesada e alcoólica enquanto que a cerveja que não continha lúpulo era amarga, muitas vezes mais leve, menos alcoólica e de cor castanho escuro [2]. A última era mais consumida em cidades, enquanto que a *A/e* era mais consumida no meio rural [2].

A cerveja *ale* sem lúpulo no final do século XVI foi desaparecendo e o cereal mais utilizado pelos cervejeiros começou a ser a cevada, pois este é o cereal que é mais fácil de maltar. Cada local começou a ter a sua cerveja com características que dependiam das

matérias primas presentes nessa região. Entretanto na Bélgica e Alemanha, pessoas especializaram-se e começaram a produzir a cerveja de trigo. Introduziu-se impostos sobre a cerveja e medidas para a segurança alimentar dos consumidores. Uma das leis mais importantes impostas à cerveja foi a Lei da Pureza. Esta lei foi criada em Ingolstadt, Baviera, pelos Duques Wilhelm IV e Ludwig X em 1516 devido à má prática na produção de cerveja por parte dos cervejeiros. Estes cervejeiros introduziam ervas, plantas e madeiras, que originava o mal-estar dos consumidores levando em caso extremos à morte. Esta lei teve como objetivo melhorar a qualidade da cerveja, que era nesta época um dos alimentos principais da população bávara. A Lei da Pureza alemã obrigou os cervejeiros produzir cervejas somente com três ingredientes: água, cevada e lúpulo. Posteriormente foi introduzido o quarto ingrediente, a levedura, visto que nesta altura se desconhecia a função da mesma. Hoje em dia, a lei da pureza ainda está em vigor em todas as cervejarias alemãs. [2]

Durante a era medieval, a cerveja tornou-se uma bebida muito consumida pela população agrícola no centro e norte de Europa. As cervejas com teor de álcool mais baixas foram implementadas na dieta diária das pessoas, visto que eram consumidas diariamente em casa. As cervejas fortes eram maioritariamente consumidas em festas locais e/ou religiosas. Nesta altura, só a elite bebia vinho e a cerveja era produzida entre os meses de Outubro e Março, pois havia um alto risco de contaminação na produção de cervejas no verão. Cerveja caseira representava metade da cerveja produzida no final do século XVII. sendo as cervejas comerciais normalmente produzidas em tavernas ou em pequenas cervejarias. [2]

As proporções de produção das cervejas domésticas ou privadas não se diferenciaram no século XVIII. No entanto introduziu-se um novo tipo de cerveja, a Porter. Esta cerveja foi criada em Londres e foi muito popular nesta cidade. Este género de cerveja é uma mistura de três bebidas: *ale* castanha fresca, *pale ale* madura e *ale* castanha maturada. Devido à sua cor castanha, esta cerveja consegue disfarçar a deterioração da cor promovida pelo envelhecimento. A sua robustez e os baixos custos de produção foram essenciais para a produção em massa. Devido à sua popularidade, foi necessário criar toneis com capacidade de 5000 hl. O preço da cerveja também ajudou a sua popularidade, visto que esta custava menos 25% em comparação à *pale ale*, cerveja que competia com a Porter pela popularidade. [2]

Devido a industrialização, aumento da população, urbanização e à sua popularidade, houve um grande aumento de produção de cerveja no século XIX. Os países que consumiam mais cerveja eram a Grã-Bretanha, Bélgica e Alemanha. Os Estados Unidos produziam menos cerveja que a cervejaria *Whitebread* em Londres no final deste século. Os níveis de consumo por capita aumentaram 50% em alguns países europeus. Este aumento deve-se maioritariamente à introdução das linhas de ferro, que permitiram a distribuição das cervejas locais para todo o país. Dado isto, as cervejarias privadas subiram drasticamente a sua

produção, enquanto que a produção doméstica de cerveja diminuiu. As cervejarias tornaram-se num negócio muito capitalizado e com grande quantidade de mão-de-obra especializada. Devido ao crescimento desta indústria, os governos conferiram mais importância ao sector cervejeiro e donos das cervejarias ficaram bem vistos socialmente e politicamente. Entre as décadas de 1870 e 1890, a maioria das cervejarias mundiais tornaram-se públicas principalmente as cervejarias com maior dimensão. Na Baviera, como sempre exceção à regra, só 1% das cervejarias tornaram-se públicas, no entanto, estas cervejarias eram as maiores nesta zona da Alemanha. [2]

Durante este século, uma nova prática de fermentação foi descoberta pelos cervejeiros, onde produtores da Europa viajaram à Grã-Bretanha para aprender esta nova técnica [2], [3]. No entanto, poucos sabiam que esta “nova” prática de fermentação era utilizada na Baviera desde o século XV [2], [3]. A *Bottom Fermentation* tem a característica da levedura decantar no fundo no final da fermentação e a baixa temperatura de fermentação (4°C – 10°C) [2], [3]. Com este método de fermentação tem-se de utilizar temperaturas baixas a rondar os -2 a 4°C na maturação [2]. O nome da cerveja com esta fermentação característica é *lager*. [2], [3]

A produção da cerveja no início do século XX aumentou novamente, sendo os maiores produtores desta bebida fermentada os Estados Unidos, o Reino Unido e a Alemanha. No entanto, devido à primeira Guerra Mundial, a produção da cerveja diminuiu na Europa, devido à falta de matérias-primas para a produção da cerveja e ao aumento dos preços da mesma. No Reino Unido e na Alemanha a produção diminuiu 37% e 57% respetivamente entre 1915 e 1919 (em comparação com os dados entre 1910 e 1915). Demorou 40 anos para que a produção da cerveja voltasse aos valores de 1913. Cervejarias locais e regionais continuavam a ser os principais fornecedores de cerveja. Só as maiores cervejarias tinham a capacidade de distribuir nacionalmente e internacionalmente, sendo a última muito limitada. Durante os anos 1939 -1945, a produção de cerveja na Europa diminuiu, só os Estados Unidos, Canada, Austrália e Reino Unido tiveram um crescimento na produção de cerveja. Nos anos após a segunda guerra mundial, estes valores diminuíram ou mantiveram-se constantes em alguns países. Mas entre 1960 e 1990, a produção mundial da cerveja triplicou. Os principais consumidores eram os jovens adultos e o volume de álcool na cerveja em média rondava os 4% - 6% ABV.[2]

O maior crescimento na produção de cerveja notou-se nos países de Sul da Europa (Portugal, Espanha, Itália, Grécia) e nos países do Hemisfério Sul, nos quais a cerveja não era uma bebida popular. No Brasil, por exemplo, o *output* da cerveja aumentou seis vezes entre 1970 e 1990. No mesmo período, a África do Sul aumentou dez vezes a sua produção. No último quarto do século XX, a comercialização das cervejarias internacionais tinha como objetivo a China. Este país tinha o consumo por capita muito baixo, no entanto devido à sua

numerosa população, a quantidade de cerveja bebida ultrapassou os Estados Unidos no início do século XXI. Alemanha, Grã-Bretanha e Estados Unidos contabilizaram neste século com menos que um terço da produção mundial. [2]

Durante esta época, a liberdade e poder de compra de produtos alcoólicos levou ao aumento do consumo de álcool em excesso. Isto também indúzio a violência e a dependência destas bebidas, maioritariamente nas zonas pobres urbanas. Por isso, em 16 de Janeiro de 1920, entrou em vigor a Lei “*Volstead Act*”, que proibiu a produção e venda de bebidas alcoólicas nos Estados Unidos. Consequentemente os cervejeiros tomaram o interesse em produtos fermentados a partir do leite. Legalmente era permitido produzir cerveja com um conteúdo de álcool a não exceder os 0,5%, no entanto este tipo de cerveja não foi popular. Em 7 de Abril 1933, esta lei foi modificada e permitiram os cervejeiros a produzirem cerveja com 3,2%. Isto levou à normalização das restrições às bebidas alcoólicas no final deste ano. Cervejarias sofreram muito nestes anos da lei seca, no entanto a recuperação foi rápida. [2]

No final do século XX, produziu-se um novo tipo de cerveja a *light beer*. Esta cerveja contém menos calorias e menos teor de álcool. Hoje em dia, este tipo de cerveja é muito popular nos Estados Unidos, tendo sido a cerveja mais bebida em 2005. No entanto, a população dos Estados Unidos desde 1980 tem vindo a gostar mais de cervejas antigas como por exemplo a *Pale Ale* e a *Porter*. Este movimento trouxe as microcervejeiras, pois estas cervejas são produzidas em pequena escala e a popularidade das cervejas artesanais alastrou-se para os países europeus. [5]

Hoje, mais que metade das cervejas são produzidas por 5 empresas: *AbinBev*, *Heineken*, *Carlsberg*, *SAB Miller* e *CR Snow Breweries* [6]. Em 2014, foram consumidos 189,06 milhões de litros de cerveja, os cinco países com a maior produção desta bebida fermentada são a China (44,853 mil kL), Estados Unidos (24,172 mil kL), Brasil (14,146 mil kL), Rússia (10,012 mil kL) e por último a Alemanha (8,441 mil kL) [7], [8]. A Ásia é o continente onde se bebe mais cerveja, com 64,247 mil kL, seguida pela Europa com 51,036 mil kL [7], [8]. O país que bebe mais cerveja per capita é a República Checa (142,6 L), seguido pelas Seicheles (114,6 L) e Áustria (104,8 L) [7], [8]. A Alemanha é o 4º país que consome mais per capita com (104,7 L) [7]. A Bélgica e a Holanda são os países que produzem mais em excesso, com 53% e 49% respetivamente [8]. O sector cervejeiro, em 2014, contribuiu com 500\$ bilhões e 13 milhões de pessoas trabalham neste sector [9].

2.1.2 Tipos de Cerveja

Como referido anteriormente, novas cervejas foram criadas de acordo com os desejos dos consumidores bem como com o estilo de vida nas diferentes épocas, como por exemplo a *Porter* na Inglaterra. Hoje em dia existem aproximadamente 5000 cervejarias em todo o

mundo. Também se pode estimar que cada cervejaria produz em média 8 cervejas diferentes. Como isto, existem cerca de 40000 diferentes cervejas à venda no mundo. Estas cervejas podem ser do mesmo género, no entanto a sua individual criação e cultura define cada cerveja. [2]

Os diferentes estilos de cervejas são criados através da combinação e relacionamento dos ingredientes, processos utilizados, embalagem, marketing e cultura. Os ingredientes habituais são a água, hidratos de carbono fermentáveis (em forma de malte, amido), lúpulo e levedura. Estes ingredientes podem ser diferentes para criarem diferentes cervejas, como também podem ser utilizados em inúmeras combinações. Em relação aos processos, existem inúmeras variáveis que podem influenciar o aroma, *flavor*, aparência, etc. Um exemplo é a moagem do malte, na qual o tipo e o tempo de moagem podem influenciar o *flavor* da cerveja final. O embalamento pode influenciar várias formas o produto final, caso seja usada uma linha de enchimento, a mesma vai introduzir diferentes níveis de oxigénio à cerveja final, o que afeta a estabilidade do *flavor*. Outro exemplo é a utilização da pasteurização, em que o produto final é submetido a temperaturas elevadas que modificam a cerveja. O marketing, por sua vez, afeta não só a maneira de consumo da cerveja, como também o ambiente e o temperamento das pessoas. O marketing tem um papel fulcral na apresentação de um género de cerveja e a subsequente cultura na mente do consumidor. Por fim, a cultura também tem uma influência importante no consumo de cerveja. Esta pode diferenciar-se pelos fatores políticos, sociais e religiosos. Por exemplo a Lei da pureza alemã (*Reinheitsgebot*) foi um fator importante para a produção de géneros de cervejas *all-malt*. [2]

No entanto, existem várias variáveis para distinguir uma cerveja da outra e que por sua vez ajudam a definir uma cerveja. A tabela seguinte (Tabela 1) foi retirada do jornal *Brauindustrie*, a partir do artigo foi feito pelo Professor Anton Peidel do *Institut für Bräuerei Technologie und Mikrobiologie der Technischen Universität München* em Weihenstephan: [2]

Tabela 1 - Diferentes variáveis para a classificar uma cerveja [2]

Original gravity (balling)	Organic acids
Alcohol	Pyruvate
Real extract	Citrate
Water content	Malate
Caloric content	L-Lactate
Protein	D-Lactate
Raw protein	Acetate
Free amino nitrogen	Gluconate
Proline	Total polyphenols
Minerals	Anthocyanogens
Potassium	Bitterness
Sodium	Dissolved carbon dioxide
Calcium	Fermentation by-products
Magnesium	Glycerol
Total phosphorus	<i>n</i> -Propyl alcohol
Sulfate	<i>i</i> -Butyl alcohol
Chloride	<i>i</i> -Amyl alcohols
Silicate	2-Phenylethanol
Nitrate	Ethyl acetate
Copper	<i>i</i> -Amyl acetate
Iron	Acetaldehyde
Manganese	Diacetyl
Zinc	2,3-Pentanedione
Vitamins	Total sulfur dioxide
Thiamin	Hydrogen ion concentration (pH)
Riboflavin	Viscosity
Pyridoxine	Apparent degree of fermentation
Pantothenic acid	Attenuation limit, apparent
Niacin	Color
Biotin	

Nos Estados Unidos da América, devido às várias competições de cervejas entre 1980 e 1990, foi necessário criar métodos de avaliação da qualidade da cerveja. Consideraram-se as seguintes variáveis [2]:

- Aparência – Claridade; Espuma; Retenção de Espuma; Cor
- Aroma – Relacionado com o malte; relacionado com o lúpulo; relacionado com a fermentação; relativo ao embalamento; relativo à idade da cerveja
- *Flavor* – relacionado com o malte; relacionado com o lúpulo; relacionado com a fermentação; relativo ao embalamento; relativo à idade da cerveja; equilíbrio; níveis de carbonatação; Final de Boca
- Corpo
- Potabilidade e impressão em geral

Devido à necessidade de um guião para os juízes de concursos como a *World Beer Cup*, a associação dos cervejeiros, em inglês *Brewers Association*, desenvolveu um guião com características gerais para uma variedade de cervejas que se chama *Beer Style Guidelines* [2]. Desde os anos 80, estes guiões evoluíram com o aumento do *know how* da cerveja, como

também devido às preferências das pessoas [2]. O guião dos estilos da cerveja integra quatro fundamentos [10]:

- Análise: revisão dos exemplos de cervejas tradicionais que são produzidas comercialmente [10];
- Degustação e recordação: Anos de experiências sensoriais de todos os tipos de cerveja [10];
- Experiências na produção de cerveja [10];
- Sugestões anuais submetidas por cervejeiros internacionais.

Para a análise foi redigida uma lista de fatores mais importantes para a determinação analítica entre cervejas. Estes fatores são [11]:

- Cor;
- Densidade original;
- Extrato real;
- Grão de fermentação;
- Limite de atenuação;
- Grau alcoólico;
- Amargura;
- Dióxido de carbono dissolvido;
- Subprodutos da fermentação – diacetilos, ésteres, vários tipos de álcoois
- Viscosidade

Com estes parâmetros, os dados de um grupo de cervejas, considerados representativos do estilo de cerveja, foram examinados e estatisticamente considerados para representar os limites gerais do estilo em cada campo de análise acima referido. As cervejas escolhidas eram geralmente consideradas exemplos clássicos e populares de um estilo no mercado atual ou tendência atual. [2]

A degustação e registo é feita pelo mesmo grupo de pessoas que desenvolveu uma estrutura para descritores de estilos de cervejas. Este grupo era composto por cervejeiros profissionais, juizes de cervejas profissionais, autores e peritos na área da cerveja. Esta mistura de pessoas foi crucial para o desenvolvimento de uma linguagem e formato de apresentação do guião. [2]

Com novas experiências na produção da cerveja, é possível uma pessoa perceber as bases para a formulação de diferentes estilos de cervejas. Também com mais experiência, é

possível perceber os efeitos dos processos, equipamentos e enchimento. Em relação às sugestões anuais, pelo menos uma vez por ano, profissionais da indústria cervejeira submetem comentários relativamente à precisão do guião. Reconhecendo que algumas definições de estilo continuam a evoluir ou podem não ser totalmente precisas, cada estilo é sujeito a revisão com base em sugestões, comentários e justificações fornecidas. [2]

Como referido anteriormente, existem dois grupos base de cervejas: a Lager e Ale. Estes diferenciam-se maioritariamente pela temperatura de fermentação. [12]

As Lagers são consideradas cervejas de Inverno onde a temperatura de fermentação é de 6°C. O primeiro indício desta cerveja foi na Baviera por volta do século XV, onde as cervejas passaram a ser produzidas nas caves [2], [13]. A fermentação mais fria reduz a produção de esteres e outros derivados que induzem o sabor [2], [13]. O paladar das mesmas é mais leve e as cervejas são mais carbonatadas [2], [13]. Os estilos mais conhecidos são a Helles, Bock, Schwarzbier, Vienna, Malzeber, Pilsen, American Light Lager [2], [13]. As leveduras utilizadas são as *Saccharomyces pastorianus* e *Saccharomyces carlsbergensis*, que tem a característica de se depositar no tanque de fermentação. [2], [13]

Para as Ales, as leveduras utilizadas são as *Saccharomyces cerevisiae*, que trabalham entre os 14° e 25°C, sendo assim consideradas cervejas de verão [13]. Ao contrário das Lager, as ales têm uma alta fermentação, na qual dura sete dias [13]. A levedura liberta álcool, CO₂ e outros derivados sendo os esteres mais evidentes no perfil da cerveja [13]. Os estilos mais conhecidos são a IPA, Weiss, Brown Ale, Saison, Stout, Porter e Pale Ale. [12], [13]

A cerveja utilizada neste trabalho foi a *Heifeweizen Bier*. O aroma deste tipo de cervejas é frutado e fenólico [2], [10]. Esteres tipo banana são uma propriedade muito comum neste tipo de cervejas [2], [10]. Esta cerveja necessita no mínimo 50% de malte de trigo e a quantidade de lúpulo é reduzida e por isso o *flavor* e aroma do lúpulo não é perceptível [2], [10]. A *Weissbier* é normalmente muito carbonatada, no entanto a elevada densidade inicial e teor alcoólico fazem com que esta cerveja tenha um corpo medio/cheio [2], [10]. A cor é muito pálida como a *pale amber* e, devido à presença das leveduras, esta cerveja tem o *flavor* da levedura [2], [10]. A densidade inicial desta cerveja está entre os valores de 1.047 e 1.056 e a densidade final ronda os valores 1.008 e 1.016 [2], [10]. O teor alcoólico é usualmente entre os 3.9 e 4.4% e a amargura em IBU está entre 10-15. A cor em EBC ronda os 3-9 [2], [10].

2.2 Matérias Primas da Cerveja

A cerveja tem de conter quatro ingredientes base: o malte, o lúpulo, água e a levedura [2]. Todos estes ingredientes base da cerveja podem dar características diferentes à cerveja

e cervejeiros tem a capacidade de criar receitas com as diferentes propriedades dos ingredientes [2], [14], [15].

2.2.1 Água

Esta é considerado o ingrediente principal na produção de cerveja, pois os diversos minerais, pequenas quantidades de gases e compostos orgânicos contidos na água que podem produzir cervejas finais distintas. Os cervejeiros normalmente dispõem de uma fonte de água, na qual muitos deles optam em tratar a água para que tenha as funções requeridas. Nas cervejarias são utilizados quatro tipos diferentes de águas, estas são, a água para a fabricação da cerveja, água do processo, água para uso geral e água de serviço. [2]

A água utilizada para a fabricação da cerveja é, como acima referido, um ingrediente da cerveja. Esta água necessita de tratamento, na qual se ajusta a quantidade dos diferentes minerais para obter a composição desejada para a produção da cerveja. Relativamente à água para o processo, esta é utilizada para limpeza e esterilização do equipamento e canalizações, na qual deve ser potável e pouco dura. A água de serviço é a água utilizada para a alimentação da caldeira, que deve ser desmineralizada. [2]

2.2.1.1 Sais Minerais

Como referido anteriormente, as propriedades da cerveja dependem dos minerais da água, na qual os principais minerais são o sódio, cálcio, sulfato e o cloro [2].

Sódio (Na)

O ião de sódio (Na^+) dá à cerveja final o corpo e uma sensação na boca dependendo das concentrações em que estiver presente na água [2]. Numa concentração entre 150 mg/L e 200 mg/L, a cerveja é salgada [2], [16], [17]. No entanto, em concentrações por volta dos 100 mg/L, o ião de sódio contribui para dar à cerveja um toque adocicado [2], [16], [17].

Magnésio (Mg)

Águas com concentrações acima de 30 mg/L de ião de magnésio (Mg^{2+}) dão a cerveja um sabor amargo e azedo [2]. Todavia, em concentrações entre 10mg/L e 30 mg/L, este ião ajuda o crescimento das leveduras, visto que este composto é um nutriente para as mesmas [2], [16], [17]. O ião de magnésio tem influência no controlo do pH, no entanto como este é mais solúvel do que o ião de cálcio, o mesmo é menos eficaz [2], [16], [17].

Cálcio (Ca)

O principal ião para controlo do pH é o ião de Cálcio (Ca^{2+}), principalmente na brassagem do mosto [2]. Ao adicionar 100 mg/L, o mosto diminui 0,4 valores no pH ao aumentar o nível dos Azoto total solúvel e aminoácidos livres no mosto da cerveja, como também devido à limitação da extração de polifenóis e sílica [2], [17]. Este ião protege a α -amilase da inibição térmica, melhora a clarificação do mostos e ajuda na coagulação das proteínas [2], [17]. Outras funcionalidades do ião de cálcio é melhoramento na floculação e crescimento da levedura [2], [17]. Devem-se utilizar águas com concentrações de Cálcio entre os 80 mg/L e 120 mg/L para a produção de cerveja [2], [17].

Sulfato (S)

O sulfato na forma de ião (SO_4^{2-} ou H_2S^{2-}) salienta a amargura do lúpulo adicionando à cerveja [18]. Em altas concentrações de sulfato, isto é acima de 400 mg/L, a cerveja fica com o perfil adstringente [18]. As concentrações normalmente utilizadas para estas cervejas é entre 50mg/L e 150 mg/L [16]–[18].

Cloro (Cl)

O anião Cl^- , ao contrário do sulfato, aumenta a plenitude do paladar e traz um toque adocicado à cerveja [2], [18]. Concentrações superiores a 300 mg/L podem induzir o sabor a cloro devido aos compostos cloro fenólicos [2], [18]. Este composto é normalmente utilizado nesta industria em concentrações entre 0 mg/L a 250 mg/L [2], [16]–[18].

2.2.1.2 Propriedades da água

Como referido, as propriedades da água são importantes na produção da cerveja. As principais características que tem de se ter em conta são: pH, alcalinidade e dureza. [2]

pH

O pH é uma medida científica para a acidez, que por sua vez é a concentração de lões de Hidrogénio H^+ em solução [19]. Uma solução com valores de pH acima de 7 é considerada alcalina, enquanto que uma solução com valores de pH abaixo de 7 é considerada ácida [18], [19]. Uma solução é considerada neutra quando a concentração da mesma for igual a 7 [18],

[19]. Na brasagem, o pH do mosto é determinante para a atividade enzimática, na qual os limites ideais são entre 5,2 e 5,6 [19].

O aumento ou diminuição do pH depende da concentração dos diferentes minerais da água e/ou minerais adicionados ao mosto [19].

A diminuição do pH durante a brasagem é maioritariamente consequente à precipitação dos fosfatos e aminoácidos derivados do malte [2], [19]. Na adição de sulfato de cálcio (CaSO_4) no mosto, os aminoácidos e os fosfatos criam um ião insolúvel, libertando os iões de hidrogénio e iões de sulfato [19]. O pH nos valores ideais na brasagem aumenta a taxa de escoamento, como aumenta o extrato, níveis de Azoto solúvel total e aminoácidos livres [19]. Outra influência que o pH tem durante na brasagem é na fase final que se denomina como *batch-sparge*, pois limita a excessiva extração dos polifenóis e sílica [19]. Estes dois compostos existem em maior quantidade em pH mais elevados [19].

Como referido anteriormente, as enzimas são influenciadas pelo pH. A β -glucanase tem o pH ótimo nos 6, enquanto que as proteases e a β -amilase têm o pH ótimo aos 5,5. Por fim α -amilase tem o pH ótimo aos 5,2. [19]

A outra enzima na brasagem da cerveja é a Fitase que tem como objetivo de reduzir o pH do mosto da cerveja ao produzir fosfato através do ácido fítico. O fosfato reage com o cálcio e magnésio que por sua vez reduz o pH. [18]

Dureza da água

A dureza da água é a medida para determinar as concentrações de magnésio, cálcio e bicarbonatos na água, na qual os dois primeiros são as principais constituintes da dureza da água [15]. Uma água é considerada “macia” em concentrações <50 mg/l de carbonato de cálcio, enquanto que uma água é considerada “dura” quando as concentrações são maiores que 400 mg/L [15], [20]. Esta propriedade tem interesse devido à extração de compostos desejados ou indesejados da água [15], [20]. Em águas duras, o pH do mosto tende a diminuir [15], [20].

Existem dois tipos de dureza: a temporária e a permanente. A diferenciação entre as duas durezas é nas diferentes propriedades da ebulição. A dureza permanente não é afetada pela ebulição, visto que o cálcio está em forma de um ácido forte, por exemplo o sulfato de cálcio. A dureza temporária, que também se pode chamar por alcalinidade total, é afetada pela ebulição, pois o cálcio está presente em forma de um ácido fraco, por exemplo o bicarbonato de cálcio. O mesmo quando aquecida transformam-se em carbonato de cálcio, que

por sua vez é insolúvel em água. O carbonato de sódio precipita e é removido na ebulição. [15]

Alcalinidade da água

A alcalinidade da água é determinada através da concentração dos íons bicarbonato e carbonato, que por sua vez estão maioritariamente presentes na forma de sais de magnésio, cálcio, potássio e sódio [15], [17]. Esta propriedade tem na indústria da cerveja o efeito contrário da dureza, isto é, em águas alcalinas o pH tende a aumentar [15], [17]. Os carbonatos e os bicarbonatos agem também como tampão reduzindo as variações do pH no mosto [15], [17].

Em meios com elevadas alcalinidades pode aumentar o pH, no entanto é possível diminuir o pH através da utilização de maltes escuros, ebulição, maltes acidulados ou adicionando ácidos. Em meios com baixa alcalinidade não é possível a utilização de maltes escuros, pois os mesmos diminuem o pH do mosto. [17]

Outro parâmetro utilizado para quantificar a alcalinidade é a alcalinidade residual. Esta é uma medida de alcalinidade depois do ácido do malte reagir com a dureza da água. Esta medida ajuda a prever o pH da brasagem em função do perfil químico das águas e na cor da cerveja/tipo de malte.[17]

2.2.2 Grãos maltados e não maltados

As cervejas podem ser preparadas através de grãos de cereais, grãos de cereais maltados e pão [6], [21]. A preparação da cerveja mais utilizada na Europa, e mais simples, é com grãos maltados e não maltados [6], [21]. Os cereais maltados utilizados na produção da cerveja são a cevada, trigo, *sorghum*, centeio, aveia e milhete, na qual a primeira é a mais utilizada [6], [21].

O malte é um cereal que sofre um processo de germinação em condições ambientais controladas [6], [21]. Um dos objetivos deste processo é o desenvolvimento das enzimas, visto que estas estão pouco presentes em cereais não maltados [6]. Outros objetivos são a quebra das paredes celulares, de modo que as enzimas possam ter acesso ao substrato do malte, degradação da proteína e do amido para que possam ser utilizados durante a brassagem e fermentação e produtos *Maillard*, que são responsáveis pela colorização do malte e pelos aromas especiais [6]. Nisto o malte fornece a cor à cerveja, como também o extrato fermentável, *flavor* e espuma [6].

Como referido anteriormente, a cevada é o cereal mais utilizado na cerveja, na qual costuma estar presente em forma de malte [2]. As cevadas, como outros cereais, é considerado um fruto, visto que o mesmo possui um pericarpo [2]. Este cereal é produzido em vários locais pelo mundo fora, no entanto, o crescimento da cevada é maior em zonas com climas moderados [2], [6]. Existem dois tipos de cevada: a *Hordeum vulgare* e a *Hordeum distichon* [2], [6], [22]. A cevada *Hordeum vulgare*, conhecida também por *six row barley*, tem um maior conteúdo de enzimas para a conversão de amido em açúcares fermentáveis, mais proteínas, menos amido e casca mais fina que a *Hordeum distichon*, conhecida também por *2 row barley* [2], [6], [22].

O trigo é a seguir à cevada o malte mais comum. O trigo é o terceiro cereal mais cultivado, na qual os produtores principais são a China, Índia, Estados Unidos e Rússia. Este cereal contém um maior teor de proteína que a cevada e produz cerveja com mais corpo e densas. O malte de trigo tem um poder diastático que converte o seu próprio amido, o que significa que pode ser utilizada em grandes quantidades para fazer a cerveja de trigo. Por lei, a cerveja de trigo na Alemanha de conter no mínimo 50% deste malte, no entanto a maior parte contém 70%. [23]

Géneros de malte

Existem 4 categorias de malte e estas diferenciam-se pelo tempo, temperatura e teor de humidade na qual o malte está sujeito na secagem. As quatro categorias de malte são o malte base, malte caramelizado ou cristal, malte torrado e malte fumado (roasted). [23]

O malte base é feito em baixas temperaturas e sofre uma breve torra. Por isso, este tipo de malte tem a cor mais leve de todos os maltes. Devido a dissociação do amido e das enzimas em altas temperaturas na secagem, o baixo nível de secagem confeciona um malte com um maior nível de potenciais açúcares e um teor de poder diastático mais elevado em comparação com outros tipos de malte. Nisto, o malte base contribui com grandes quantidades de açúcares à cerveja e são capazes de não só converter o seu próprio amido, como também são capazes de converter o amido de outros tipos de malte com menor poder diastático. Devido a estas propriedades, cervejeiros utilizam mais este malte e normalmente uma receita é composta por 85% do mesmo. Os cereais utilizados para este tipo de malte são a cevada e o trigo, pois estes dois cereais contêm um alto teor de enzimas. [23]

O malte caramelizado, também denominado por cristal, é torrado após a germinação. No processo de secagem, os grãos são aquecidos a temperaturas entre os 65°C e 70°C. Nestas temperaturas as enzimas são ativas. Estas enzimas convertem o amido em açúcar dentro do grão, deixando-os num estado semilíquido. Após este processo de conversão, os grãos são torrados em temperaturas entre os 105°C e 160°C, dependendo da cor e *flavor* desejado. As altas temperaturas na secagem causam a caramelização dos açúcares,

tornando-os menos fermentáveis. Estas temperaturas também induzem o escurecimento do grão devido a reações Maillard. Maltes que são levemente caramelizados produzem *flavors* de caramelo e mel, enquanto que malte caramelizado escuro produz caramelo mais ricos, açúcares queimados e sabores a passas. [23]

Maltes torrados são produzidos a partir da estufagem em temperaturas que rondam os 168°C de maltes base secos. As temperaturas elevadas e a secagem de baixa humidade aumentam as reações Maillard com menor caramelização. Isto produz um malte com cor castanha e *flavors* tostados, com nozes e biscoito. [23]

Por fim, a quarto tipo de malte é o malte fumado, na qual são considerados os maltes mais escuros e com *flavors* mais intensos. Este é o malte que induz a cor preta às Stouts e Porters. Para produzir este gênero de malte é necessário secar o malte verde a 75°C. Quando os grãos estiverem secos, a temperatura é aumentada para os 215°C – 250°C. Este processo pode causar a caramelização do grão, no entanto a cor e *flavor* derivam maioritariamente das reações Maillard. Nestas temperaturas existe a possibilidade de os grãos queimarem e, por isso, para prevenir que tal aconteça é necessário pulverizar água. Esta secagem em altas temperaturas transforma os grãos em grãos pretos e induz *flavors* de chocolate, café e torra. Este tipo de malte é utilizado normalmente em pequenas quantidades (3%-5%) numa receita de cerveja. [23]

2.2.3 Lúpulo

Lúpulo é uma planta que cresce numa trepadeira e cervejeiros utilizam especialmente a planta de lúpulo feminina que tem como nome científico de *Humulus Lupulus* [2], [6]. Hoje em dia é possível produzir esta planta em todo lugar [2]. A localização depende das condições de crescimento e climáticas, no entanto também é influenciada pela necessidade de produção local de um país, que são maioritariamente locais de crescimento tradicionais desta planta [2], [6]. Nisto, a produção de lúpulo é dominada pela Alemanha e EUA, contabilizando por 60% da produção total de lúpulo em todo o mundo [2], [6]. Pode-se comercializar o lúpulo em duas formas: em cones e em forma de *pallets* [2], [6], [24]. Em cones são os lúpulos que são colhidos na trepadeira e sofrem uma operação de secagem sem outras operações de processamento, enquanto que a segunda é formalizada a partir dos cones desta planta, que por sua vez são prensados [2], [6].

Como dito anteriormente, esta planta é capaz de crescer em todo o mundo [2], [6]. No entanto, para o crescimento de lúpulo com intenções de comercialização, condições como um solo fundo e fértil são importantes para o crescimento [2]. Outras condições são verões quentes e invernos frios, como também um abastecimento adequado de água [2], [6]. Não pode haver pestes nem doenças, no entanto em caso de existência da mesma, é necessário

ter meios de combater tais circunstâncias [2], [6]. Por último, esta planta tem de estar exposta ao sol pelo menos 13 horas, caso contrário a planta não se desenvolve [2]. Por isso, o lúpulo normalmente é produzido em zonas entre as latitudes 35 e 55 [2].

Existem três tipos de lúpulo, estes são, lúpulos que induzem o aroma (por exemplo o lúpulo Herzbrucker), lúpulos que induzem o amargor à cerveja (por exemplo a Zeus) e lúpulos que induzem ambas as propriedades acima referidas (Perle) [2], [25]. As diferentes características desta planta são conferidas pelos diferentes teores e propriedades das resinas e óleos essenciais, que se podem encontrar nesta planta [2], [25]. As resinas do lúpulo são compostas maioritariamente por ácidos α e ácidos β [2], [25], [26]. Estes ácidos estão presentes na glândula lupulina [2], [25]. O ácido α é a principal causa para o amargor do lúpulo [2], [25], [26]. Estes ácidos são feitos a partir de humulona, cohumulona, e adhumulona, na qual a segunda produz um amargor mais forte [2], [25]. O ácido β não é solúvel como o ácido α , por isso, induz suavemente o sabor amargo à cerveja [2], [25]. Relativamente aos óleos essenciais, estes são responsáveis pelo aroma e *flavor* da cerveja [2], [25]. Estes óleos são extremamente voláteis e não sobrevivem a ebulições longas [2], [25]. Por isso, lúpulos contendo altos teores de óleos são normalmente postos nos últimos 20 minutos da ebulição [2], [25].

2.2.4 Levedura

A levedura é o microrganismo mais importante na produção de bebidas fermentadas, pois é responsável pela formação de etanol, dióxido de carbono e produtos metabólicos que contribuem para o sabor do produto final [6], [15], [27]. Esta dá a cerveja sabor e aromas desejados [6], [15]. As propriedades da levedura como por exemplo a floculação, capacidade de fermentação, pressão osmótica, tolerância ao etanol e o requerimento de oxigênio têm um impacto crítico no desempenho da fermentação [6], [15], [27].

A levedura tem tido uma evolução de modo que cervejeiros tem a possibilidade de utilizar várias estirpes de levedura [6], [15]. Cervejeiros usualmente utilizam a levedura de uma fermentação para começar a próxima fermentação [6], [15]. Esta operação levou à seleção de estirpes de levedura para se usar durante a fermentação de cervejas [6]. Esta seleção é mais evidente na propriedade de floculação das leveduras [6]. A levedura na cerveja tem a capacidade de flocular até ao fundo, que é removido no final da primeira fermentação, deixando suficiente levedura em suspensão para realizar a segunda fermentação [6]. Também é notável que muitas leveduras que fermentam no topo do mosto formam pequenas cadeias de células inseparáveis [6], [15].

Este grupo de microorganismos é predominante na forma unicelular e o tamanho da mesma depende do ciclo de crescimento, condições de fermentação e idade da célula [2], [6],

[15]. É considerada ser um ser eucariota e maior parte das estirpes das leveduras que são usadas na cerveja são anaeróbios facultativos do género *Saccharomyces* e da espécie *Saccharomyces cerevisiae* [6], [15], [27]. No entanto existem dois tipos de levedura que são usados na fermentação da cerveja, dependendo do tipo da mesma, isto é, na produção de *Ales* a levedura usada são do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto que na produção de *Lagers* a levedura utilizada é a *Saccharomyces carlsbergensis* [6], [15].

Com o desenvolvimento das técnicas microbiológicas no século XIX e posteriori, foi possível ao cervejeiro isolar e preservar uma estirpe de levedura. Atualmente é comum manter as estirpes desejadas com a ajuda de meios líquidos ou sólidos. Após o crescimento da cultura, a mesma é mantida a 2-4°C, de modo que seja possível diminuir o processo de morte das células.[27]

Como referido anteriormente, a levedura é utilizada para converter os açúcares contidos no mosto em etanol, dióxido de carbono e outros produtos de fermentação. Por isso, é importante que a levedura seja eficiente em converter estes açúcares [6]. Na fermentação da cerveja, os açúcares convertidos pelas estirpes de levedura são a glucose, sacarose, frutose e maltose [2], [6], [27]. No entanto, as mesmas não são capazes de converter as dextrinas e maltotrioses e por isso estes açúcares consideram-se como açúcares não fermentáveis [2], [6]. O primeiro passo para a utilização de qualquer açúcar do mosto é a passagem intacta da mesma pela membrana da levedura ou a hidrólise na fora da membrana da célula seguida pela entrada de todos ou alguns produtos de hidrólise [2], [6]. A maltose e maltotriose são exemplos de açúcares que passam para a célula de levedura intactas enquanto que as dextrinas e sacarose necessitam de ser hidrolisadas por uma enzima extracelular, nomeadamente a glucoamilase e amiloglucosidade, para se obter açúcares simples [2], [6], [27]. Como a maltoses e maltotrioses são os dois açúcares mais abundantes no mosto da cerveja, é necessário que a estirpe de levedura seja correta para que se possa converte-los [2], [6], [27]. Após a entrada destes açúcares no mosto, é necessário fazer uma hidrólise com a ajuda da enzima α -glucosidase para se obter Glucoses [2], [6], [27]. Esta, por fim, vai para a via metabólica, na qual o processo é demonstrado no esquema abaixo (Figura 1) [27]:

2.3 Processo de Produção de Cerveja

Se a produção da cerveja fosse inventada hoje, os seguintes processos seriam considerados tecnologicamente inapropriadas para a produção da cerveja [2]. No entanto, a produção da cerveja tem vários anos e sofreu alterações para melhoramento na eficiência, controle, lucro e na quota do mercado [2], [15]. O diagrama que se encontra em baixo estão descritas as etapas da produção de cerveja que se utiliza na maior parte do mundo (Figura 1) [2], [15]:

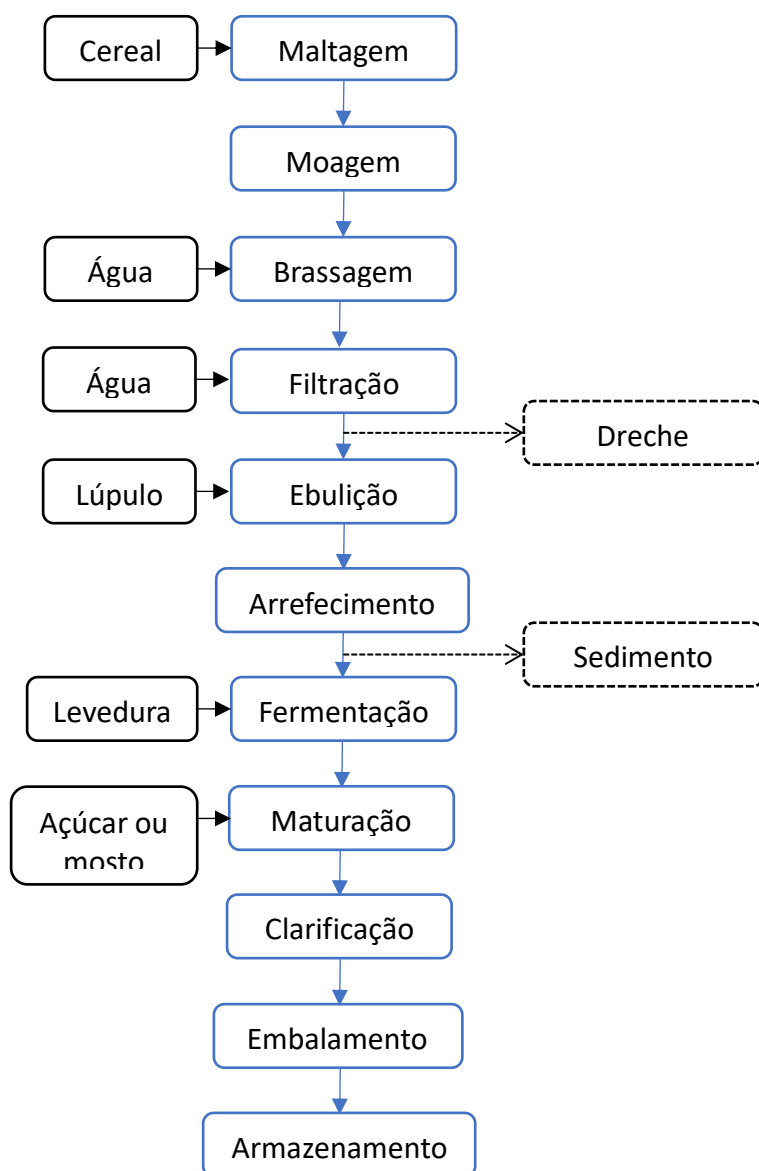


Figura 1 - Etapas da produção de cerveja [2], [15]

2.3.1 Maltagem

A Maltagem é constituída por três processos: Molha, Germinação e Secagem [2], [28]. Esta cadeia de processos é utilizada para simplificar proteínas, criar nutrientes para as

leveduras, desenvolver enzimas e para converter amido insolúvel para amido solúvel [2]. Em outras palavras, a maltagem é o processo na qual o grão é modificado de modo que os açúcares estejam livres para as enzimas na brassagem [2], [6], [15], [28].

O primeiro processo que o cereal sofre é a molha, na qual os cereais são molhados com água fria [28]. Este processo tem a duração de 48 horas e a água tem de ser drenada periodicamente [2]. A molha tem como objetivo hidratar o endosperma do cereal, de modo que a humidade do cereal é aumentada de 15% para 45% [2], [6], [15], [28].

Após a molha, os grãos são postos numa “cama” para germinarem [2], [28]. Existem dois tipos de camas: a pneumática e a tradicional [22]. Independentemente do tipo de cama, os grãos têm de ser areados periodicamente, por mão ou por máquinas [2], [22]. Durante este processo, o grão cria e liberta a hormona giberlina que por sua vez ativa a produção de várias enzimas no grão [2]. Estas enzimas juntamente com as enzimas já presentes no grão, começam a quebrar as reservas do grão [2], [6]. Esta modificação de proteínas e do conteúdo de enzimas é definida nos seguintes 6 dias [2], [6], [29]. Quanto maior o tempo de germinação, mais modificado é o malte [2], [6].

No processo seguinte, a secagem, o cereal é submetido a ar seco para parar a germinação do malte [2], [28]. O principal objetivo deste processo é secar o mais que possível em temperaturas baixas (por volta dos 33°C) para preservar as enzimas do malte [2], [6]. Esta etapa é constituída por três secagem, na qual a primeira dura 24 horas [2]. A segunda secagem dura 48 horas em temperaturas a rondar os 49°C [2]. A terceira secagem dura 24-48 horas a 80-120°C e tem a função de torrar o malte [2]. Esta última secagem influencia o sabor, o aroma e a estabilidade do malte [2]. O estilo de malte é determinado pela temperatura e duração da secagem [2], [6], [15], [28].

2.3.2 Moagem

A moagem é o esmagamento do malte, na qual a casca fica intacta [2], [6], [15]. O objetivo desta operação é deixar as enzimas e os polímeros do endosperma expostos e a casca ajuda na filtração a cerveja [2]. Esta operação tem de se praticar para todos os maltes, como também para outros grãos de cereal maltados ou não maltados dependendo do tipo de cerveja e a sua finalidade [2], [15]. O tipo de moagem é definido consoante o sistema de filtração utilizado e do sistema de brassagem [2], [6], [15].

2.3.3 Brassagem

A brasagem é a etapa onde os maltes e outros cereais moídos são misturados em água quente na qual as enzimas degradam as proteínas e o amido, resultando num extrato de açúcares, isto é, o mosto [2], [14]. Durante esta etapa deve-se deixar o mosto numa

temperatura durante um espaço tempo definido, de modo a que seja possível às enzimas converter o amido e dextrinas em açúcares solúveis, degradar as proteínas, degradar ácidos nucleicos e outras substâncias [2], [6], [14], [15].

Existem quatro métodos de brasagem, na qual cervejeiros podem optar escolher por um deles dependendo do equipamento utilizado [2], [14]. Um dos métodos chama-se *Infusion Mashing*, onde o mosto da cerveja é exposto a uma temperatura, sem mexer o mosto [2], [14]. Para utilizar este método é necessário que o malte seja de alta qualidade [2]. Outro método é o *Decoction Mashing*, na qual o mosto é sujeito a diferentes temperaturas [2], [14]. São necessários equipamentos mais sofisticados, no entanto o malte não tem de ser de alta qualidade [2]. Neste processo, o mosto da cerveja é retirado para ser aquecido e, posteriormente, é posto dentro da panela de brasagem de modo a aumentar a temperatura [2], [14]. Este processo pode-se fazer até três vezes [2], [14]. Deste modo, é possível ter temperaturas ótimas para a proteólise (40-50°C), hidrólise de amido (54-65°C) e separação do mosto (por volta dos 70°C) [2], [14]. O terceiro método de brassagem chama-se *Double Mashing* [2], [14]. Este método é utilizado quando existem cereais adjuntos que necessitam de um pré-cozedura antes da brasagem com o malte base [2]. São necessários dois recipientes, na qual num é aquecido o cereal adjunto a 85°C durante dez minutos [2], [14]. Por fim, o quarto método é um programa com diferentes temperaturas [2], [14]. Este começa normalmente nos 35°C, aumentado posteriormente para 50°C, 65°C e 75°C [2], [14]. O equipamento utilizado para este processo tem de ter um sistema de circulação do mosto, onde o mesmo sai e entra novamente, passando entre os grãos [2]. Com esta circulação, a eficiência de extração do amido, enzimas e proteínas é maior [2].

Amido

Encontra-se o amido no endosperma do grão [2], [30]. O mesmo é constituído por um polímero de glucoses que é composto por dois tipos de moléculas [2], [6]:

- Amilose – Uma cadeia linear de glucoses com ligações α -1,4, que constituem 20-25% de todo o amido;
- Amilopectina – Constituída por uma cadeia de glucoses com ligações α -1,4 com ramificações de α -1,6.

Estas ramificações ocorrem em cada 27 resíduos de glucose [2]. A amilopectina tem uma estrutura com alto peso molecular [2], [6].

Durante a brassagem, este composto é desnaturado pelas enzimas para a produção de açúcares fermentáveis e não fermentáveis [2], [6]. Cervejeiros tem a capacidade de observar o estado de desnaturação com solução de iodo, visto que ao introduzir esta solução no mosto com amido, o mosto fica roxo [2].

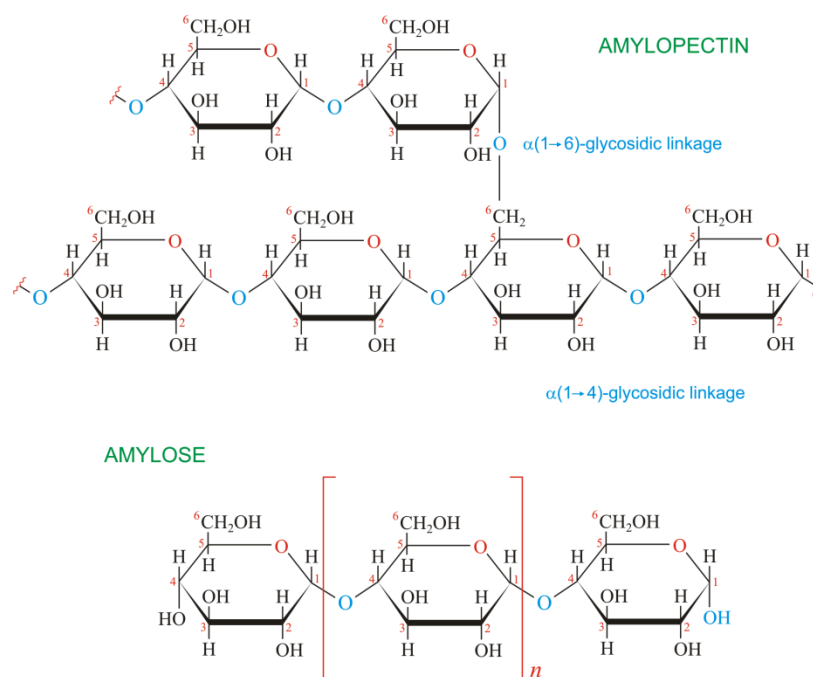


Figura 2 - Composição do amido: amilose e amilopectina. [31]

2.3.4 Filtração

Na filtração os grãos são separados do mosto [2], [6], [15]. Para o tipo de brasagem *Infusion*, esta ação é feita no mesmo recipiente, no entanto para os outros sistemas é necessário de um segundo recipiente ou um filtro [2]. Ambos aceleram este processo, pois o segundo recipiente, *lauter tun*, possibilita uma filtração rápida devido ao grande diâmetro e profundidade [6]. O filtro, usa pressão e tem uma profundidade de cama (bed depth) muito pequena que também aceleram a extração [6]. O principal objetivo desta operação é obter uma alta quantidade de açúcares das matérias sólidas residuais [2], [6], [15]. Para ajudar este processo, muitos cervejeiros utilizam o *batch-sparge*, que é adicionar água quente por cima dos cereais filtrados para retirar os restantes açúcares que ficaram entre os grãos [2].

2.3.5 Ebulição

Os processos anteriormente referidos também são utilizados para bebidas destiladas como por exemplo o whisky, no entanto esta etapa é só utilizada na produção de cerveja [2]. Após a filtração e o *batch-sparge*, o mosto é aquecido a 100°C e é adicionado lúpulo ao mosto [2], [6], [15]. Este processo tem a duração de uma a duas horas, dependendo do estilo de cerveja [6]. Os objetivos da ebulição são os seguintes [2]:

- Esterilização do mosto de modo que as bactérias e leveduras não competem com a levedura da cerveja;
- Extração dos compostos de amargor, de sabor e óleos do lúpulo;
- Coagulação do excesso de proteínas e taninos formando uma partícula solúvel que pode ser removida;
- Formação de cor e sabor;
- Remoção de compostos voláteis indesejáveis, como por exemplo dimetilsulfureto;
- Concentrar os açúcares através da evaporação da água.

2.3.6 Sedimentação (*turb removal*)

Este processo é necessário devido à formação de matérias coaguladas durante a ebulição, que tem de ser removidos para a estabilidade da cerveja final [2], [6], [15]. Existem vários métodos de remoção, na qual a escolha depende do equipamento e do tipo de lúpulo utilizado [6]:

- Coador de lúpulo – Este utensílio é necessário caso a utilização de lúpulo em forma natural, no entanto também é necessário outro estágio para remover o sedimento;
- Centrifugadora – Uma centrifuga para mosto quente é um método eficaz para remover o sedimento da ebulição, todavia este utensílio é caro.
- Sedimentação/Floculação – As partículas grandes formadas na ebulição sedimentam-se rapidamente devido à sua grande dimensão. Por isso, ao deixar o mosto arrefecer em recipientes grandes, as partículas floculam para o fundo do mesmo recipiente. Estas são trazidas para cima através de bolhas de ar, que posteriormente conseguem ser retiradas pelas extremidades do recipiente.
- Filtração – As partículas podem ser retiradas através do processo de filtragem usando terra de diatomáceas
- *Whirlpool* – Este é técnica de separação mais simples. Esta processo é criado através de uma força centrífuga no mosto num tanque cilíndrico. O resultado deste fenómeno é a sedimentação das partículas no fundo do tanque.

2.3.7 Refrigeração do mosto

No processo de refrigeração, cervejeiros tem de ter em conta a limpeza e higienização do espaço de trabalho, utensílios e das máquinas, pois em temperaturas baixas o mosto está suscetível a contaminações [2], [6], [15]. O mosto é refrigerado a partir da temperatura de

ebulição até à temperatura de fermentação. Este processo é feito através da troca de calor entre o mosto e o meio de água [2], [6], [15]. Para *Ales* a temperatura de fermentação ronda os 14°C a 17°C enquanto que nas *Lagers* ronda os 8-13°C [2], [6], [15].

2.3.8 Fermentação

Na fermentação, a levedura assimila açúcares simples, aminoácidos, minerais e outros nutrientes [2], [6], [15]. Os açúcares simples são depois convertidos para etanol, dióxido de carbono e ésteres [2], [6], [15]. A levedura escolhida pelos cervejeiros tem de controlar a eliminação dos *flavors* indesejados [2], [6], [15]. Existem quatro operações que tem de se ter conta durante a fermentação: O manuseamento da levedura, a adição da levedura, a fermentação em si e a remoção da levedura [32].

O manuseamento da levedura é encarado com importância para obter uma fermentação eficaz e um produto final de qualidade [2], [32]. Estas culturas são normalmente reutilizadas e, por isso, deve-se ter em conta manter a viabilidade e vitalidade da cultura [2], [32]. A sobre-produção desta cultura é vendida às indústrias alimentares e destilarias [2], [32].

Relativamente à adição da levedura, esta pode ser adicionado diretamente ao mosto no tanque de fermentação ou em linha enquanto o mosto é introduzido no fermentador [2], [32]. Tipicamente, são adicionados 5 a 20 milhões de células por mililitro de mosto [32]. Oxigénio também é adicionado no fermentador, pois este é um fator fulcral para a produção das membranas das células [2], [32].

Como referido anteriormente, existem dois tipos de fermentação, na qual o uso de cada uma depende do tipo de cerveja. Na fermentação das *Ales*, a levedura utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae* [2], [32]. Esta é uma levedura que fermenta no topo do mosto a temperaturas entre os 14°C e 17°C [2], [32]. A fermentação das *Ales* é rápida e exotérmica e, por isso, é necessário refrigerar e controlar a temperatura da cerveja [2], [32]. A fermentação nem sempre fica completa, no entanto pode-se refrigerar a cerveja para induzir a floculação da levedura e para deixar açúcares livres que dulcificam a cerveja final [2]. A levedura é retirada mais cedo que nas *Lagers* para impedir a produção de *flavors* indesejados pela levedura, como também para possibilitar uma reprodução mais viável [2], [32]. Hoje em dia, a fermentação decorre maioritariamente em fermentadores cilíndricos [2]. A fermentação da *Lager* é em temperaturas mais baixas (8-13°C) e levedura utilizada é a *Saccharomyces oatorianus* ou *Saccharomyces carlsbergensis* [2], [32]. A *Lager* tradicional envolve a primeira fermentação usando levedura floculante, na qual de seguida faz-se a fermentação secundária usando levedura não floculante[2]. Posteriormente, a cerveja é posta a 0°C para estabilização [2]. Hoje em dia, utiliza-se só uma fermentação e o envelhecimento da cerveja é feita a temperaturas menores que 0°C [2].

Apesar da fermentação das *Lagers* e das *Ales* terem as suas diferenças, a base do processo de fermentação é similar, visto que ambas leveduras convertem açúcares e proteínas em álcool, dióxido de carbono, novas células de levedura e compostos de *flavour* [14]. No início da fermentação, a levedura parece estar dormente devido à sua atividade quase inexistente, na qual se chama fase de latência [14]. No entanto, a levedura está a adaptar-se ao novo ambiente e a reproduzir-se através das reservas de glicogénio da célula [14]. O oxigénio também tem um papel relevante pois à medida que o mesmo é consumido pela levedura e as condições anaeróbicas prevalece, a levedura transporta açúcares para dentro da célula em forma de piruvato, na qual é seguidamente metabolizada para etanol e dióxido de carbono [2], [14], [32]. Ambos são seguidamente transportados para fora da célula e o CO₂ sai do fermentador [2], [14], [32]. Só resta um certo nível de dióxido de carbono na cerveja para dar efervescência [2], [14], [32]. No final da fermentação, os açúcares já são escassos ou inexistentes e a levedura flocula, criando uma cerveja limpa e saborosa [2], [14], [32]. De seguida, a cerveja é separada da levedura sedimentada [2], [14].

2.3.9 Maturação

A maturação serve para transformar a cerveja madura para um produto estável e de qualidade adequada para filtrar e engarrafar [2], [15]. Os objetivos deste processo é a clarificação, carbonatação e maturação dos *flavors* da cerveja [2]. Para este processo é necessário utilizar um tanque fechado sem oxigénio e em baixas temperaturas [2].

A carbonatação da cerveja é feita a partir das restantes leveduras, que utilizam o resto dos açúcares, ou uma nova fonte de açúcares, para fermentarem novamente [2], [15]. Como o tanque é fechado, o dióxido de carbono formado fica dissolvido na cerveja [2], [15]. Ao mesmo tempo formam-se gases e substâncias voláteis que são fontes de maturação dos *flavors* [2], [15]. Durante este processo e devido às temperaturas baixas, polipeptídeos e poliéster ligam-se criando flocos [2]. Estes flocos são posteriormente retirados por sedimentação ou por filtração [2]. A sedimentação de flocos é muito devagar e normalmente opta-se por utilizar o método seguinte, a clarificação [2], [15].

2.3.10 Clarificação

À exceção de algumas cervejas, como por exemplo a *Weiss*, a etapa para clarificar a cerveja é necessária [2], [15]. Esta clarificação é feita através do processo de filtração, na qual produz uma cerveja efervescente e clara durante o seu tempo de prateleira [2], [14], [15]. Os métodos utilizados são filtração com terras diatomáceas, centrifugadoras e filtração por fluxo tangencial [15]. No entanto, estas filtrações têm de ser seguidas por um filtro de celulose [15].

A filtração é o último processo com oportunidades de modificar a cerveja antes de ser engarrafada[2], [14], [15]. Usualmente corrige-se o amargor, a espuma e o nível de carbonatação ao adicionar ou remover CO₂ [2], [14], [15].

2.3.11 Engarrafamento e Armazenamento

O engarrafamento pode-se fazer em três formas: garrafa, barril ou lata [2], [14], [15]. A utilização de cada embalagem depende dos fatores políticos, históricos e geográficos [2]. O enchimento pode-se fazer à mão ou em linhas de enchimento próprias para cada tipo de embalagem [2]. Após o enchimento, as garrafas vão para o armazém prontas para serem distribuídas [2].

2.4 Enzimas

Enzimas são proteínas que tem a capacidade de acelerar reações de dissociação de diferentes substâncias [33], [34]. Esta age como catalisador para aumentar o rendimento de reações químicas sem modificar a estrutura química das mesmas [33]. A enzima tem a capacidade de se ligar ao substrato, de modo que diminuem a energia de ativação resultando a reações mais rápidas em menores temperaturas [33]. As ligações com o substrato são através de pontes de hidrogénio, ligações iónicas e interações hidrofóbicas [33], [35]. O rendimento das enzimas depende da temperatura exposta, pois cada enzima tem a sua temperatura ótima [33].

Como referido anteriormente, o processo de produção de cerveja envolve a extração e dissociação dos hidratos de carbono e das proteínas provenientes do cereal de malte e de fontes adjacentes [2]. O resultado deste processo é uma solução rica em hidratos de carbono e proteínas, que são posteriormente usadas pelas leveduras na fermentação [2], [33]. A cevada, quando maltada, tem as enzimas necessárias para degradar os compostos de interesse, estes são, amido, β -glucanos, pentosanós, lípidos e proteínas [2], [33], [34]. Caso utilizar-se cereais maltados de baixa qualidade, o cervejeiro pode então optar por introduzir enzima comerciais [2], [33].

Na maltagem, as enzimas migram da camada aleurona para o endosperma, que contem o amido [2]. A parede celular é degradada pela hemicelulase e β -glucanase enquanto que as proteínas são hidrolisadas pelas proteases [2]. Estas hidrólises ajudam a atuação das amilases sobre os grânulos de amido [2]. Por isso, para diminuir os danos químicos do cereal do malte, o mesmo sofre a secagem para parar estas reações [2].

Em relação à brassagem, as quatro principais reações enzimáticas é a hidrólise das proteínas para peptídeos e aminoácidos livres, a degradação das cadeias de β -glucano, a hidrólise das pentoses e a degradação do amido gelatinizado para hidratos de carbono fermentáveis [36]. Estes hidratos de carbono são glucose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose [2]. Cada enzima tem propriedades intrínsecas distintas, no entanto a atividade e estabilidade são dependentes dos parâmetros físico-químicos do mosto (pH, temperatura, concentração dos diferentes cereais maltados, etc.) [33]. Em relação à temperatura, cada enzima tem a sua temperatura ótima [33], [36]. Por isso, é necessário durante a brassagem aumentar a temperatura do mosto [33], [36]. As enzimas mais importantes estão demonstradas na tabela abaixo com as respetivas temperaturas ótimas (Tabela 2):

Tabela 2 - Atividade das enzimas na brassagem (Limites de temperaturas de funcionamento de cada enzima com a sua respetiva temperatura ótima) [37]

Enzimas	Temperaturas
Fitase	30 - 53 °C (35 °C)
β - glucanase	35 - 55 °C (45 °C)
Peptidase	45 - 53 °C (50 °C)
Protease	50 - 59 °C (58 °C)
β -amilase	54 - 66 °C (63 °C)
α -amilase	66 - 71 °C (70 °C)

2.4.1 Fitase

A fitase é a enzima responsável pela redução do pH inicial do mosto [6], [37]. As temperaturas de ativação desta enzima são entre 30°C a 53°C, na qual a temperatura ótima é 35°C [37]. A fase na qual esta enzima é ativa chama-se *acid rest* [6]. A fitase hidrolisa o ácido fítico para fosfato inorgânico [30]. Este fosfato liga-se ao cálcio e magnésio do mosto, reduzindo o pH [30]. A quantidade desta enzima depende do cereal maltado e a temperatura de secagem que o mesmo sofreu durante a maltagem, visto que a quantidade da fitase é menor consoante o aumento da temperatura da secagem [30]. Nisto, esta enzima é inexistente ou está presente em pequenas quantidades em cereais maltados que sofreram altas temperaturas de secagem [30]. No entanto, a elevada acidez de cereais maltados que sofreram altas temperatura de secagem é suficiente para diminuir o pH do mosto sem o *acid rest* [37].

2.4.2 β Glucanase

Esta enzima sobrevive só durante pouco tempo na brasagem e é responsável pela degradação dos β -glucanos na parede celular [2], [6]. Caso os β -glucanos não sejam desnaturados, os mesmos dissolvem-se parcialmente, ligando-se à água e causam problemas durante o processo da brasagem ao aumentarem a viscosidade e turvação [33]. Nisto, a otimização da brasagem com a variação de temperaturas melhora a atuação das amilases e aumentam os valores de aminoácidos livres [2], [6]. A exclusão da temperatura ótima dos β -glucanos podem causar problemas no escoamento da cerveja, na recuperação do extrato, na drenagem dos grãos utilizados, sedimentação lenta da levedura, eficácia baixa de centrifugação, baixa rentabilidade na filtração e problemas com turvação [2], [6].

2.4.3 Proteases e Peptidases

As proteases são enzimas sensíveis em altas temperaturas [2], [6]. Nisto, quando de utiliza o *infusion mashing* a 63-66°C, as mesmas tendem a desnaturar-se [2], [6]. As peptidases são enzimas que tem a capacidade de funcionar durante algum tempo nas temperaturas referidas na tabela 2 [37]. Ambas as enzimas funcionam em conjunto, visto que a protease hidrolisa proteínas grandes em cadeias polipeptídicas, enquanto que a peptidases hidrolisa as cadeias polipeptídicas em aminoácidos livres [2], [6], [33]. O resultado da atividade destas enzimas é a redução da turvação, a estabilidade da espuma da cerveja [2], [6]. No entanto, a mesma também é necessária para a nutrição adequada da levedura [2], [6].

2.4.4 β -amilase

A temperatura ótima desta enzima é os 63°C [37]. A β -amilase tem como objetivo hidrolisar a amilose e amilo pectina a partir das extremidades não reduzidos e hidrolisa cada segunda ligação α -1, 4 [38]. O resultado desta ação é a maltose e cadeias mais curtas de amido [2], [39]. Esta enzima é capaz de repetir este procedimento várias vezes, especialmente em moléculas de amido grandes, visto que a β -amilase tem grande afinidade para estas moléculas [2]. No entanto, esta enzima tem uma menor produtividade com cadeias menores, pois tem menos afinidade com as mesmas [2]. A β -amilase atuando sozinha tem a capacidade de converter a amilase completa em maltose [37]. No entanto, esta enzima não tem a capacidade de hidrolisar as ligações α -1, 6, de modo que ao encontrar estas ligações, a mesma para [37]. Por isso, esta enzima só converte as regiões exteriores da amilo pectina [37]. Assim, a β -amilase liberta 10-15% dos resíduos de glucose em maltose, deixando o interior da amilopectina (75-80%), que representa o extrato potencial de amido no malte [2],

[6]. Como a β -amilase liberta açúcares de maltose, esta enzima é chamada por enzima de sacarificação e enzima da fermentabilidade [2], [6].

2.4.5 α -Amilase

A α -amilase tem como temperatura ótima os 70°C e, como a β -amilase, esta só age nas ligações α -1,4, no entanto a mesma tem a capacidade de hidrolisar estas ligações em qualquer parte do amido [2], [37]. Por isso, esta enzima não produz grandes quantidades de açúcares fermentáveis (glucose, maltose e maltotriose) exceto só quando a mesma age em moléculas com dimensões reduzidas [33]. É de reparar a diminuição das moléculas de amido e a redução da viscosidade da pasta de amido quando a α -amilase está ativa [33], [39]. Por estas razões, esta enzima também é chamada por enzima liquidificadora [33]. A função mais importante desta enzima é a abertura das moléculas grandes de amido, que possibilita a ação da β -amilase [2], [6]. Todas as hidrólises das ligações α -1,4 cria extremidades nas cadeias para β -amilases [2], [6]. No entanto, como a β -amilase funciona melhor com moléculas de amido grandes, a mesma não tem um alto rendimento em quantidades excessivas de α -amilases [2], [6].

2.5 Objectivos do trabalho

O objetivo desta dissertação foi determinar a influência dos patamares de tempo/temperatura da brassagem no perfil do mosto de uma cerveja Weiss. Para tal, elaboram-se onze mostos com a mesma formulação de malte, água e lúpulo, nas quais foram retiradas amostras no decorrer da brasagem e determinaram-se diversos parâmetros físico-químicos como o pH, densidade, composição do mosto em açúcares e amido e a atividade amilolítica.

3 Materiais e Métodos

O objetivo desta dissertação foi determinar a influência dos patamares de tempo/temperatura da brassagem no perfil do mosto de uma cerveja Weiss. Para tal, elaboram-se onze mostos com a mesma formulação de malte, água e lúpulo, nas quais foram retiradas amostras no decorrer da brasagem.

3.1 Formulação e Modelo de produção de cerveja

3.1.1 Formulação do mosto

Os maltes e lúpulos foram adquiridos na empresa LX Brewery, agente oficial da *Castle Malting* (Bélgica). A moagem do malte foi efetuada nas instalações da LX Brewery, com o equipamento *Piccolo 11S* (Sommer, Alemanha). A levedura também foi adquirida na mesma empresa, da marca *Brewferm*. Os mostos para a produção de cerveja foram elaborados de acordo com a seguinte formulação:

- 2,52 kg de Malte de trigo
- 1,42 kg de Malte pils
- 1,03 kg de Malte *cara-pils*
- 7 g de lúpulo *Perle*
- 12 g de lúpulo *Hallertauer Herzbrucker*
- 28,97 L de água do Luso

3.1.2 Produção do mosto

No processo de produção do mosto o que diferiu entre as amostras em estudo foi o modelo de brassagem, descrito na tabela 3, que foi programado no aparelho de brassagem de 20L (Speidel Braumeister 20L) (Figura 4). Antes de dar início à brassagem introduziu-se 23 L de água na cuba. De seguida adicionou-se o malte no cesto, dando-se início ao processo com a submersão do malte quando a temperatura atingiu os 35°C. Tendo por base um programa padrão (Modelo) (Tabela 3), para as várias brassagens realizadas, variou-se o tempo de um dos patamares mantendo a temperatura e os restantes tempos de cada um dos outros patamares iguais aos da brassagem modelo (Tabela 3). Após o término da brassagem, o malte foi filtrado e submetido ao *batch sparge* com 5,97 L de água do Luso a 75,6°C. De seguida, o mosto foi aquecido a 100°C durante uma hora (ebulição). No início da ebulição foi adicionado 7 g de lúpulo *Perle* e 7 g de *Hallertauer Herzbrucker* e adicionaram-se os restantes 5 g de lúpulo *Hallertauer Herzbrucker* no final de 60 minutos de ebulição. Após o passo de ebulição efetuou-se o abatimento de temperatura até aproximadamente 25°C com recurso a uma serpentina de aço inox (Figura 3).



Figura 3 - Serpentina aço inox



Figura 4 - Speidel Braumeister 20L

Na tabela 3 estão descritos os diferentes modelos de brassagem.

Tabela 3 - Modelo de Brassagem das diferentes cervejas confeccionadas durante a dissertação

Nº de Brassagem	Nome dado	Temperaturas e Tempo na Brassagem
1	Modelo	35°C – 15 min; 45°C – 15 min 54°C – 15 min; 63°C – 30 min 71°C – 30 min
2	FITASE -	35°C – 10 min; 45°C – 15 min 54°C – 15 min; 63°C – 30 min 71°C – 30 min
3	FITASE +	35°C – 20 min; 45°C – 15 min 54°C – 15 min; 63°C – 30 min 71°C – 30 min
4	β -GLUCANASE -	35°C – 15 min; 45°C – 10 min 54°C – 15 min; 63°C – 30 min 71°C – 30 min
5	β -GLUCANASE +	35°C – 15 min; 45°C – 20 min 54°C – 15 min; 63°C – 30 min 71°C – 30 min
6	PROTEASES -	35°C – 15 min; 45°C – 15 min 54°C – 10 min; 63°C – 30 min 71°C – 30 min
7	PROTEASES +	35°C – 15 min; 45°C – 15 min 54°C – 20 min; 63°C – 30 min 71°C – 30 min
8	β -AMILASE -	35°C – 15 min; 45°C – 15 min 54°C – 15 min; 63°C – 15 min 71°C – 30 min
9	β -AMILASE +	35°C – 15 min; 45°C – 15 min 54°C – 15 min; 63°C – 45 min 71°C – 30 min
10	α -AMILASE -	35°C – 15 min; 45°C – 15 min 54°C – 15 min; 63°C – 30 min 71°C – 15 min
11	α -AMILASE +	35°C – 15 min; 45°C – 15 min 54°C – 15 min; 63°C – 30 min 71°C – 45 min

3.2 Amostragem

Durante a brassagem, foram recolhidas 14 amostras, com recurso à torneira da panela de brassagem. No início e no final de cada patamar de temperatura de brassagem e do patamar de ebulição efetuou-se a recolha de 2x50mL e 2x15mL para tubos Falcon de 50 e 15 mL, respetivamente. As amostras foram colocadas imediatamente em gelo e posteriormente armazenadas -80°C. Na Tabela 4 e Figura 5, está referido o momento em que cada amostra foi retirada.

Tabela 4 - Tempos de recolha das amostras

Nº da Amostra	Momento em que foi recolhida
1	Imersão do malte em água a 35°C
2	Final do patamar a 35°C
3	Início do patamar a 45°C
4	Final do patamar a 45°C
5	Início do patamar a 54°C
6	Final do patamar a 54°C
7	Início do patamar a 63°C
8	Final do patamar a 63°C
9	Início do patamar a 71°C
10	Final do patamar a 71°C
11	Início do patamar a 78°C
12	Final do patamar a 78°C
13	Início da ebulição
14	Final da ebulição

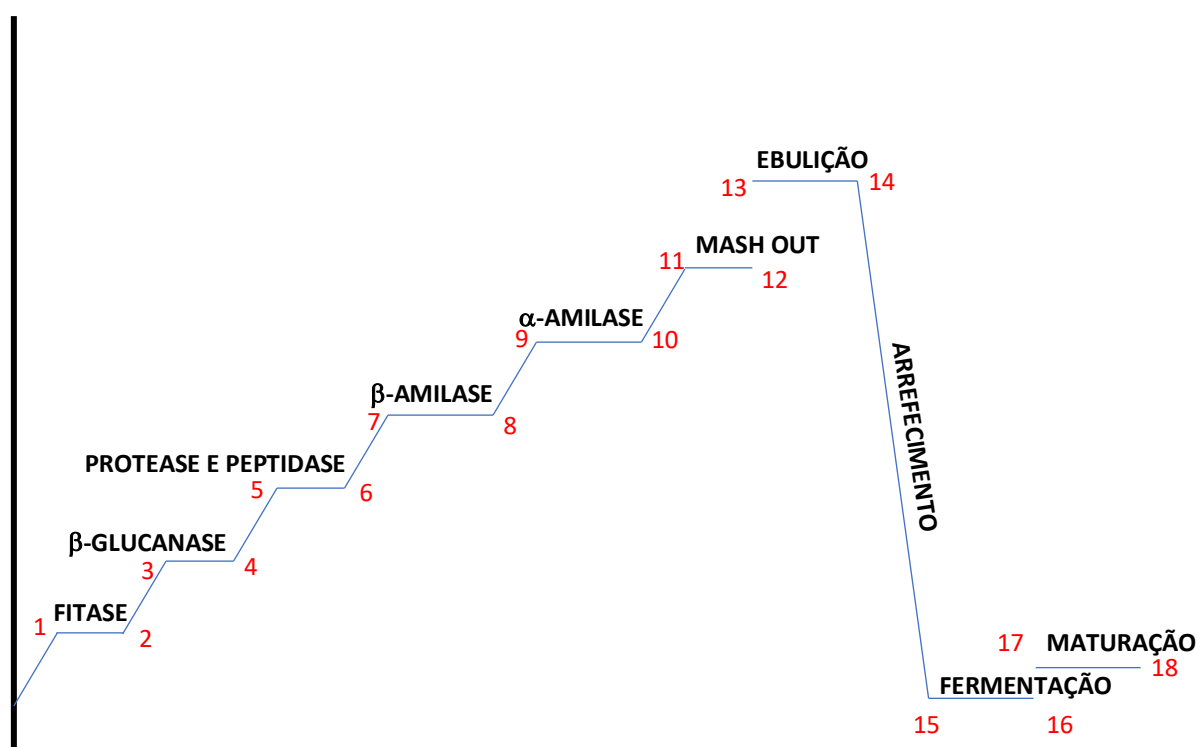


Figura 5 - Modelo de brassagem com os pontos de recolha de cada amostra (em vermelho)

3.3 Análises dos parâmetros físicos e químicos durante a brassagem

As análises efetuadas no âmbito desta dissertação foram realizadas para cada um dos pontos de amostragem no caso do pH, densidade, proteína total, turvação, a atividade enzimática, os açúcares e os ácidos orgânicos.

3.3.1 Determinação do pH

O pH foi determinado com recurso um elétrico de pH (Broadley James Corporation, Inglaterra), ligado a um potenciômetro pHM82 (Merck, EUA) previamente calibrado com soluções tampão a pH 4 e 7.

3.3.2 Determinação da densidade e massa volúmica

A densidade foi determinada com recurso a um hidrómetro que apresenta diretamente a densidade do mosto. O ensaio consistiu em colocar a amostra de mosto num recipiente cilíndrico e posteriormente introduzir o hidrómetro no mesmo. Deixou-se estabilizar o hidrómetro dentro do recipiente com a amostra e de seguida retirou-se o valor da densidade indicado na escala.

Na determinação da massa volúmica, colocou-se 1000 μ L de amostra medidos com uma micropipeta dentro de um copo e pesou-se a massa numa balança analítica (Metler Toledo, Suíça), previamente tarada com a massa do copo. Este procedimento foi efetuado pelo menos em triplicado, o resultado foi calculado com base na média das massas do mosto.

3.3.3 Determinação da proteína

A proteína total solúvel foi determinada pelo método de Bradford com recurso a um espectrofotómetro Ultrospec2100pro (Amersham Biosciences, Reino Unido). A amostra foi previamente preparada, centrifugada durante dois minutos a 12000 rpm e diluída para uma diluição 1:10 com água desmineralizada. De seguida, a amostra diluída foi misturada com o reagente Coomassie Plus Protein Assay (Pierce, EUA) na razão 1:1. Procedeu-se à leitura da densidade ótica da amostra a 595nm, tendo como referência do espectrofotómetro água. Para além da amostra, realizou-se um branco do método substituindo o volume de amostra por água desmineralizada.

Determinou-se a concentração de proteína na amostra com recurso a uma reta de calibração realizada utilizando o mesmo procedimento com soluções padrão de concentração conhecida de albumina bovina (p.a. SIGMA) (Anexo II).

3.3.4 Determinação da turvação

A turvação foi determinada com o espectrofotômetro Ultrospec2100pro (Amersham Biosciences, Reino Unido). Diluiu-se a amostra 1:10 e procedeu-se à leitura da densidade ótica a 640nm. Como referência utilizou-se a água.

3.3.5 Determinação da atividade amilolítica

A atividade amilolítica foi determinada pelo método da adição de iodo determinado com soluto de lugol.

Centrifugaram-se as amostras numa centrífuga de bancada a 6000 rpm, recolheu-se o sobrenadante e diluiu-se numa razão de 1:10 em água desmineralizada. Em paralelo, prepararam-se soluções padrão com uma concentração conhecida de amido solúvel (DIFCO Laboratories, EUA) para a realização da reta de calibração e para o padrão interno. Preparou-se igualmente uma solução de lugol em água desmineralizada, dissolvendo 2,2g de iodo ressublimado (Merck pro análise) e 4,4g de iodeto de potássio (BDH pro análise) em 100mL água desmineralizada (solução-mãe) tendo-se realizado o ensaio com uma solução de lugol diluída 1:10

Após a preparação das soluções, colocou-se 200 μ L de amostra diluída e 25 μ L de água desmineralizada dentro de um tubo de vidro. Este tubo foi arrefecido numa caixa com gelo. De seguida, introduziu-se 200 μ L da solução de padrão interno de amido (10mg/mL) em cada tubo e colocou-se cada um dos tubos em banhos a diferentes temperaturas utilizadas (35°C, 45°C, 54°C, 63°C e 71°C). Recolheram-se amostras em intervalos de tempo definidos especificados na Tabela 6:

Os tubos foram retirados nos tempos indicados e colocados novamente dentro de uma caixa com gelo. De seguida, adicionou-se 420 μ L de solução de lugol 1:10 e mediu-se a absorvância a 620nm no espectrofotômetro Ultrospec2100pro (Amersham Biosciences, Reino Unido). Para esta experiência, a referência utilizou-se a água como branco do espectrofotômetro e uma mistura de 420 μ L de solução de lugol 1:10 com 425 μ L de água como branco do método. Determinou-se a concentração média de amido na amostra utilizando a reta de calibração construída para o método (Anexo III).

Tabela 5 - Tempos de recolha para determinação da concentração de amido em cada amostra para cada brassagem analisada

Brassagem Modelo; Brassagem – α -Amilase	35°C e 45°C	
	Amostras	Tempos de recolha
	1 - 14	0, 1', 5', 10', 20'
	54°C, 63°C e 71°C	
	Amostra	Tempos de recolha
	1, 2	0', 1', 4', 8', 12', 16', 20'
	3-10	0', 1', 2', 4', 6', 8', 10'
	11-14	0', 1', 4', 8', 12', 16', 20'
Brassagem α -Amilase +	35°C	
	Amostra	Tempos de recolha
	1 - 14	0, 1', 5', 10', 20'
	45°C	
	Amostra	Tempos de recolha
	1 - 14	0, 1', 5', 20', 30'
	54°C e 71°C	
	Amostra	Tempos de recolha
	1, 2	0', 1', 4', 8', 12', 16', 20'
	3-10	0', 1', 2', 4', 6', 8', 10'
	11-14	0', 1', 4', 8', 12', 16', 20'
	63°C	
	1, 2, 3, 4	0', 1', 4', 8', 12', 16', 20'
	5-12	0', 1', 2', 4', 6', 8', 10'
	13, 14	0', 1', 4', 8', 12', 16', 20'
Brassagem Peptidase e Protease -; Brassagem Peptidase e Protease +; Brassagem β - Amilase -; Brassagem β - amilase +	35°C e 45°C	
	Amostra	Tempos de recolha
	12	0, 1', 5', 10', 20'
	54°C; 63 °C; 71°C	
	Amostra	Tempos de recolha
	12	0', 1', 4', 8', 12', 16', 20'

3.3.6 Determinação dos açúcares, etanol, glucose e ácidos orgânicos (HPLC)

As amostras utilizadas para esta determinação de açúcares, etanol, glucose e ácidos orgânicos foram as últimas amostras retiradas de cada brassagem (amostra 14).

3.3.6.1 Preparação das amostras

Para determinar os açúcares, etanol, glucose e ácidos orgânicos de cada amostra centrifugaram-se as amostras a 12000 rpm durante 10 minutos numa centrífuga de bancada

(SIGMA). Recolheu-se o sobrenadante e adicionou-se ácido perclórico (70% (v/v), Merck) numa proporção de 30 μ L por mililitro de amostra. Colocou-se a mistura de imediato em gelo durante 30 minutos. De seguida, a mistura foi novamente centrifugada durante 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante obtido foi recolhido e posteriormente diluído com água miliQ numa razão 1:10. Por fim, as amostras foram filtradas com filtros Milipore de 0,22 μ m de diâmetro de poro (BGB-Analytik, EUA), o filtrado foi colocado no tubo de amostra de cromatografia.

3.3.6.2 Preparação do eluente

Utilizou-se um frasco de Schott de 1L para preparar o eluente concentrado a 25mM, adicionando-se 1,365 mL de ácido sulfúrico, e completando o volume a um litro com água miliQ. Para obter uma solução de 5 mM foi necessário fazer uma diluição 1/5 com água miliQ. De seguida filtrou-se com filtros Milipore de 0,22 μ m e desarejou-se colocando o frasco num aparelho de ultrassons durante um mínimo de 30 minutos.

3.3.6.3 Condições de análise

O cromatógrafo de HPLC utilizado é constituído por um controlador de temperatura (CROCO-CIL, Portugal), um sistema de bomba de injeção (515 HPLC Pump, Waters) com modulo de controlo (pump control module I, Waters), uma coluna de exclusão iónica para análise de açúcares e ácidos orgânicos (SUGAR SH1011, Shodex), e um detetor de índice de refração (Refractive Index Detector 22414, Waters). [40]

Cada corrida teve a duração de 20 min e as corridas foram efetuadas em triplicado. A coluna operou a 50°C com um fluxo de 0,5 mL/min de ácido sulfúrico 5mM. A quantidade de amostra introduzida no sistema foi de 10 μ L. Para determinar as concentrações dos açúcares de interesse foram utilizadas as retas de calibração cedidas por Leandro Vieira (Anexo I) [41].

4 Resultados e discussão

Como referido anteriormente, as principais enzimas na produção da cerveja provêm do malte e são responsáveis por converter o amido em açúcares simples durante o passo de brassagem. Estes açúcares são posteriormente convertidos a álcool pelas leveduras. Para além dos açúcares, as leveduras também são responsáveis por converter proteínas e β -glucanos que por sua vez influenciam a viscosidade, turvação e a espuma da cerveja final [14].

A ação enzimática de cada enzima na brasagem depende do tipo de malte, do pH e da concentração de sais minerais e da temperatura na qual cada é sujeita. Neste sentido, foram realizados ensaios com uma receita para a cerveja Weiss. A produção da mesma foi feita com a mesma receita, variando os modelos de brassagem no que se refere ao período de duração do patamar de temperatura de cada enzima, assumindo como padrão a temperatura aconselhada para a atuação de cada enzima [37].

4.1 Caracterização físico-química do mosto durante a brassagem

Para cada ponto de cada brassagem determinou-se o pH, a densidade, a proteína total, a turvação, a atividade amilolítica e os açúcares, etanol, glucose e ácidos orgânicos para as diferentes brasagens.

4.1.1 Variação do pH

Como referido anteriormente, o pH é influenciado pelo teor de sais minerais da água utilizada para a produção de cerveja e pelo teor dos compostos de fosfato e polipéptidos que estão contidos no malte.

Como se pode constatar na figura 6, o mosto modelo tem em comparação aos outros mostos um pH menor durante o decorrer da brassagem. Esta ocorrência pode ser explicada pelo facto que o mosto modelo ter sido o primeiro mosto a ser produzido, isto é, como o malte foi comprado e moído na mesma altura, o malte utilizado para as outras brassagens alterou durante o tempo de armazenamento. Os outros cinco mostos têm valores muito parecidos entre todos durante a brassagem.

Relativamente ao comportamento de cada mosto, na figura 6 pode-se observar que todas as brasagens têm o mesmo comportamento, isto é, o pH é mais elevado no início, diminuindo na segunda e terceira amostra. De seguida o mesmo aumenta na quinta, na qual mantém o mesmo valor até à décima segunda amostra. Nas amostras retiradas na ebulição, o valor de pH diminui. Assim, no período de incubação do malte, obteve-se o pH mais elevado

para todas amostras, na qual a média foi de 5,8. Este resultado traduz o valor do pH da água do Luso [42], pois o primeiro ponto é retirado imediatamente após a introdução do malte na água [43]. De seguida, o pH diminui para a segunda amostra, que traduz a ação da fitase. Como referido anteriormente, esta enzima hidrolisa o ácido fítico para fosfato inorgânico, que se liga ao cálcio e magnésio do mosto, reduzindo o pH [18], [30].

Na quarta amostra, o pH aumenta ligeiramente e mantém-se constante durante a brasagem. Este comportamento é influenciado pelos bicarbonatos que têm poder tampão. Os bicarbonatos absorvem os iões H^+ livres provenientes da precipitação do fosfato, na forma de fosfato de cálcio [15], [44]. Outro aspeto a realçar é a diminuição do pH durante a ebulição que traduzem a precipitação do fosfato de cálcio em altas temperaturas [6].

Comparando os resultados obtidos para cada uma das diferentes brassagens (de 6 a 11) com os resultados obtidos para a brassagem Modelo (Figura 6 e 7), verifica-se que a variação de pH é relativamente pequena. Este resultado está de acordo com o esperado, uma vez que, tal como referido anteriormente, a ação da fitase será uma das principais responsáveis pela variação do pH ([37]) e em nenhum dos casos houve diferenças relativamente ao patamar a 35°C, pelo que o intervalo de tempo a esta temperatura foi igual em todos eles e igual ao modelo, sendo por isso similar o efeito registado. De igual forma, é expectável que a redução observada no final da ebulição, atribuível à precipitação de proteínas e fosfato de cálcio a temperaturas mais altas ([2]), seja semelhante para as brassagens 6 (protease +) a 11 (alfa-amilase +), dado que todas elas sofreram o mesmo período de ebulição.

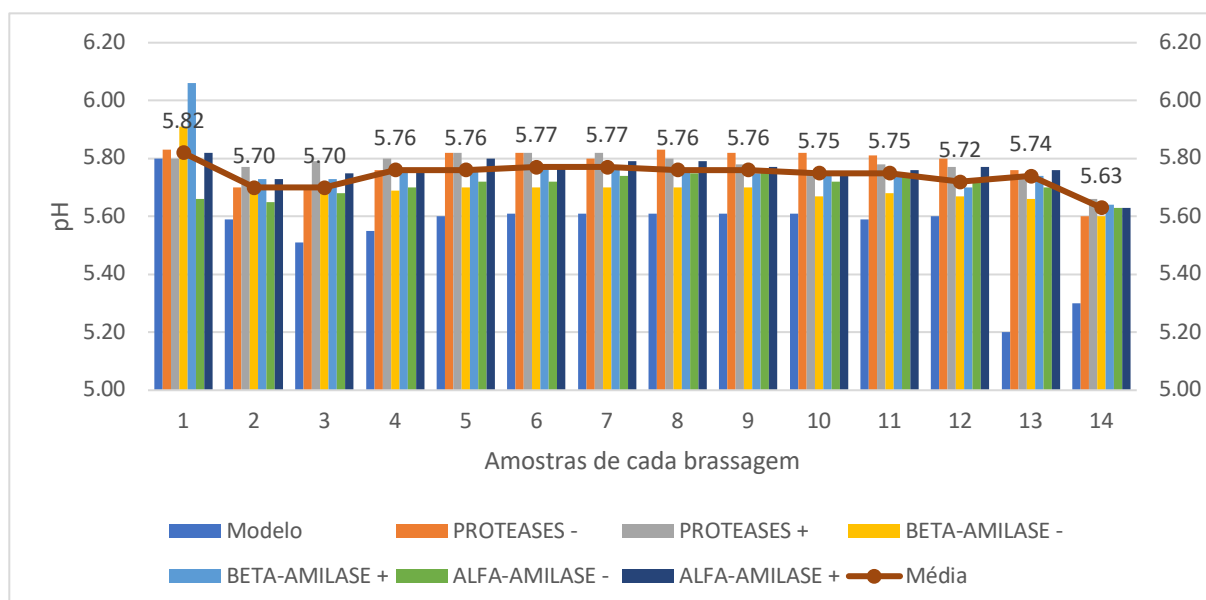


Figura 6 – Valores de pH em cada amostra por mosto

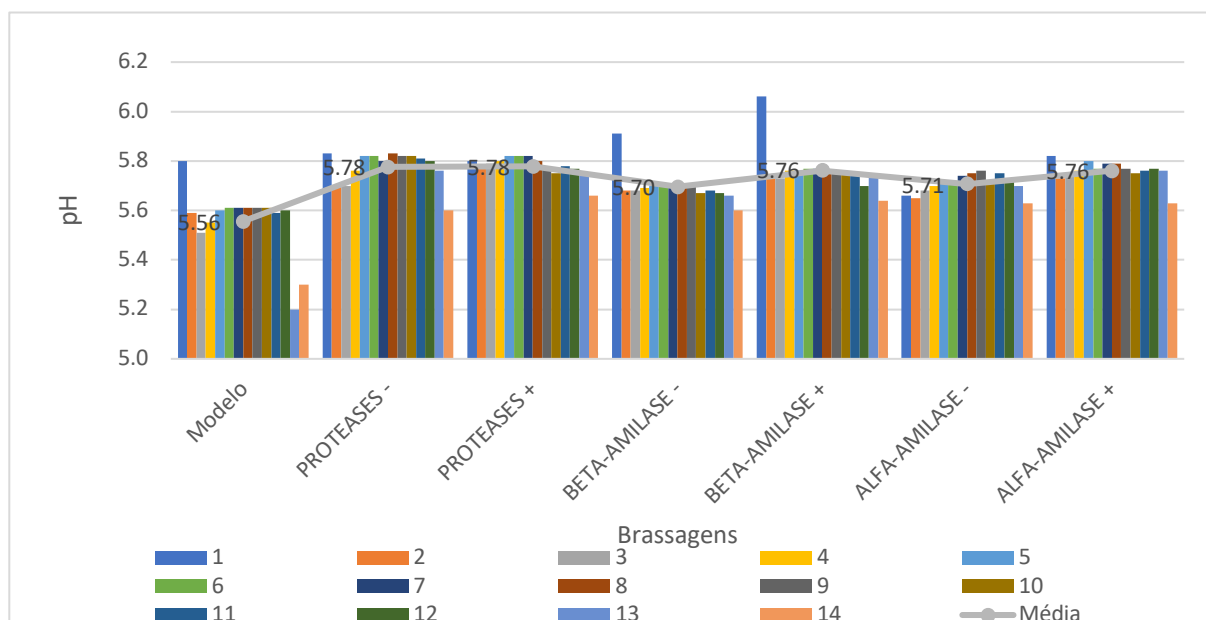


Figura 7- Valores de pH em cada mosto por amostras

4.1.2 Variação da densidade

Nesta dissertação, a densidade foi medida por dois métodos diferentes, uma por pesagem e outra com ajuda de um hidrômetro. Os valores obtidos na densidade por pesagem dependem da quantidade de todos os compostos em suspensão/solução, enquanto que os valores no hidrômetro dependem da quantidade de açúcar no mosto.

4.1.2.1 Variação da densidade com recurso ao hidrômetro

Na medição de densidade com recurso ao hidrômetro, é esperado que os valores aumentem devido à degradação das cadeias de amido em açúcares por parte das enzimas amilolíticas, e de entre estas maioritariamente devido à ação da α -amilase responsável pela degradação das cadeias de amido em açúcares simples ([37]). A partir dos resultados obtidos observa-se que a densidade varia de forma prevista, observando-se na figura 7 e 8 que a primeira amostra de todos os mostos tem um valor aproximadamente de 1, isto é, tem pouca quantidade de açúcares livres. Os valores tendem a subir gradualmente em todos os mostos até à amostra 7, que demonstra que existe a formação de substrato em temperaturas baixas numa quantidade reduzida [37]. De seguida, observou-se um aumento significativo entre a sétima e oitava amostra, e um novo aumento da nona para a décima amostra, continuando a aumentar gradualmente com menor intensidade até a décima segunda amostra. Estes resultados coincidem com os resultados esperados, observando-se um aumento acentuado entre os pontos que correspondem aos patamares de temperatura aos quais se observa maior

atividade das duas enzimas amilolíticas β -amilase e α -amilase, respectivamente, que por sua vez traduz uma maior produção de açúcares mais simples por parte das enzimas. O fato de o maior aumento de densidade se registrar no patamar de 63°C, indica que a maior parte do amido foi hidrolizado a esta temperatura, à qual ambas as enzimas têm atividade apesar de esta ser menor no caso da α -amilase. Na décima terceira amostra, houve um ligeiro decréscimo na densidade, recuperando novamente o valor de densidade entre a décima terceira e a décima quarta amostra. Esta redução deve-se ao *batch-sparge*, no qual foi acrescentado 5,97L de água sem substrato para recolher os açúcares que ainda existiam, o que provocou uma diluição dos açúcares. Relativamente ao aumento dos valores durante a ebulição, da décima terceira para a décima quarta amostra, este deve-se ao fato de ter ocorrido perda parcial de água por evaporação, concentrando assim os açúcares no mosto.

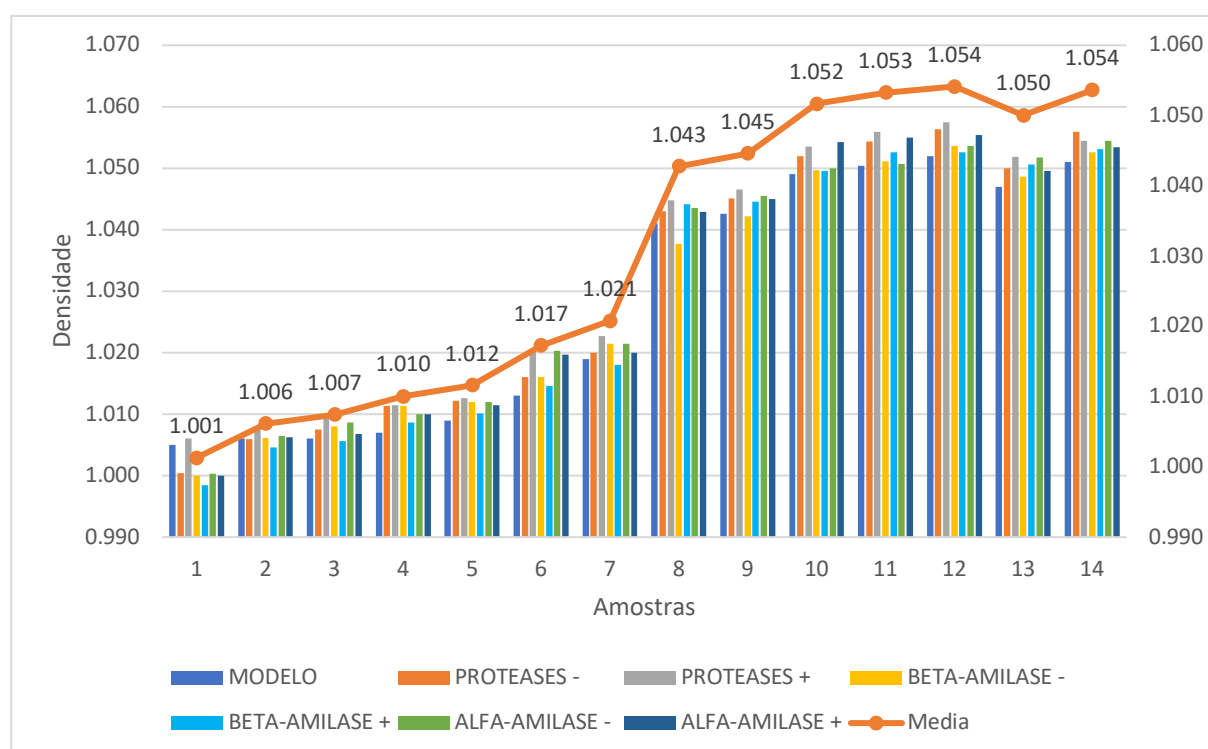


Figura 8- Densidade em cada mosto por cada amostras

Por outro lado, tal como esperado, quando se comparam os resultados obtidos para as brassagens 8, 9, 10 e 11 (Figura 8 e 9) correspondendo a uma duração menor e maior do patamar a 63°C e a 71°C, respectivamente, verifica-se que em praticamente todos os casos em que se aumentou a duração dos patamares (amostras 8 e 10) a densidade do mosto aumentou, sendo este aumento novamente mais acentuado a 63°C e refletindo o aumento da concentração de açúcares resultantes da hidrólise do amido por ação da β -amilase e α -amilase.

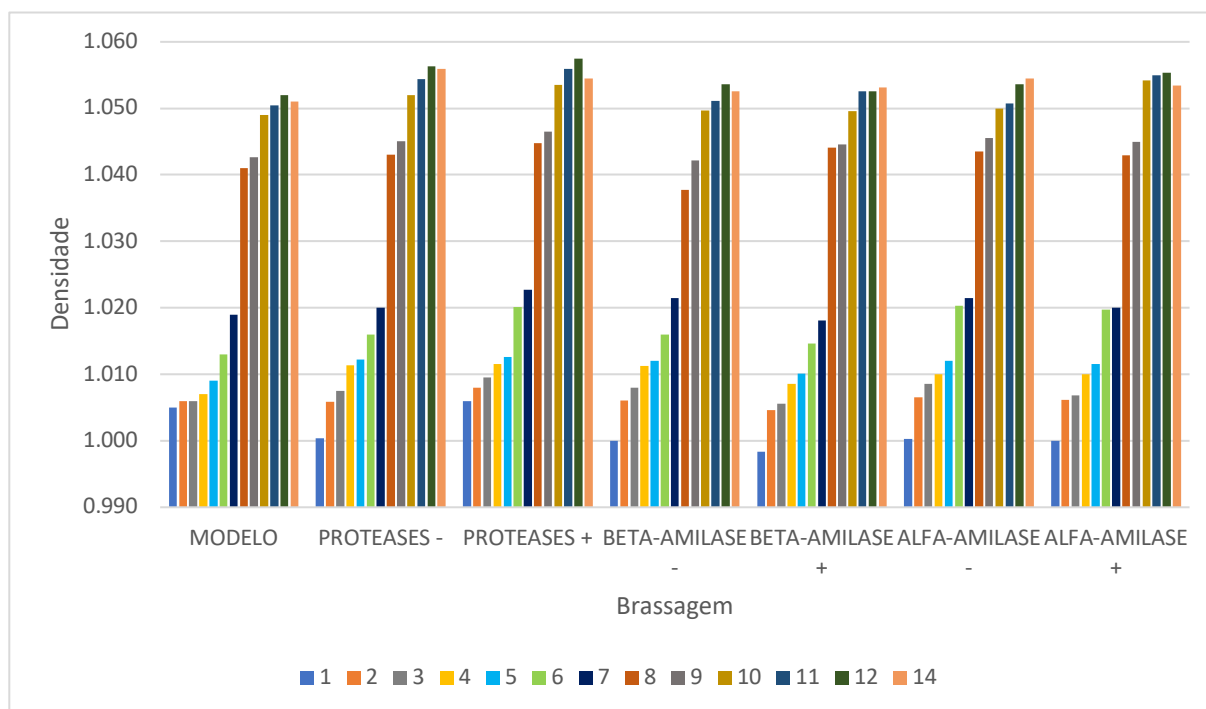


Figura 9- Densidade em cada amostra por cada mosto

4.1.2.2 Determinação da massa volúmica

Como referido anteriormente, a massa volúmica depende da quantidade de partículas solúveis e não-solúveis. Ao longo da brasagem é esperado que os valores aumentem devido não só a haver mais açúcares livres provenientes da ação amilolítica como também em resultado da libertação dos vários compostos do malte para a água.

Como se pode observar no gráfico com as medições da massa volúmica em cada mosto por cada amostra (Figura 10), os pontos da média têm um comportamento similar às médias das medições da densidade com recurso ao hidrómetro (Figura 8). Assim, a média do valor da primeira amostra é a mais baixa de todas amostras, com um crescimento gradual até à sétima amostra. Na oitava amostra presenciou-se um crescimento significativo e a partir desta medição os valores continuam a crescer gradualmente. Outra propriedade a salientar são os valores das medições da primeira à sexta amostras serem menores que 1. Pode-se deduzir que o mosto no início da brasagem tem uma massa volúmica menor que a água. Relativamente à primeira amostra em todos os mostos, pode-se considerar um *outlier* pois as mesmas contêm valores distintos entre si e das medições obtidas nas segundas amostras.

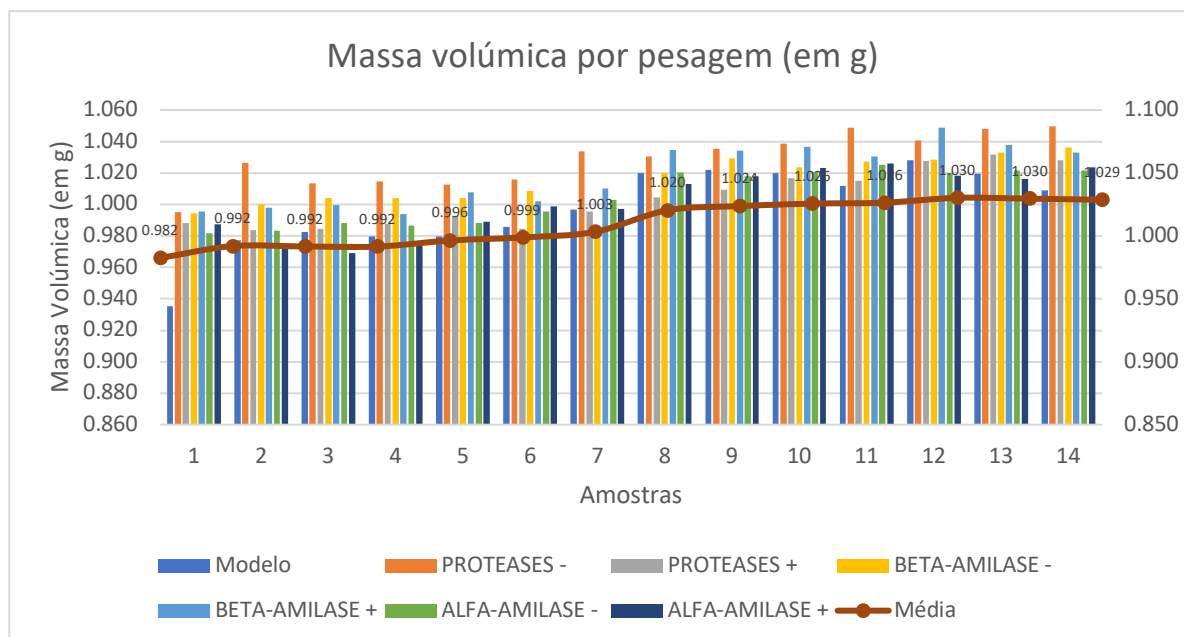


Figura 10– Massa volúmica em g/mL em cada mosto por cada amostras

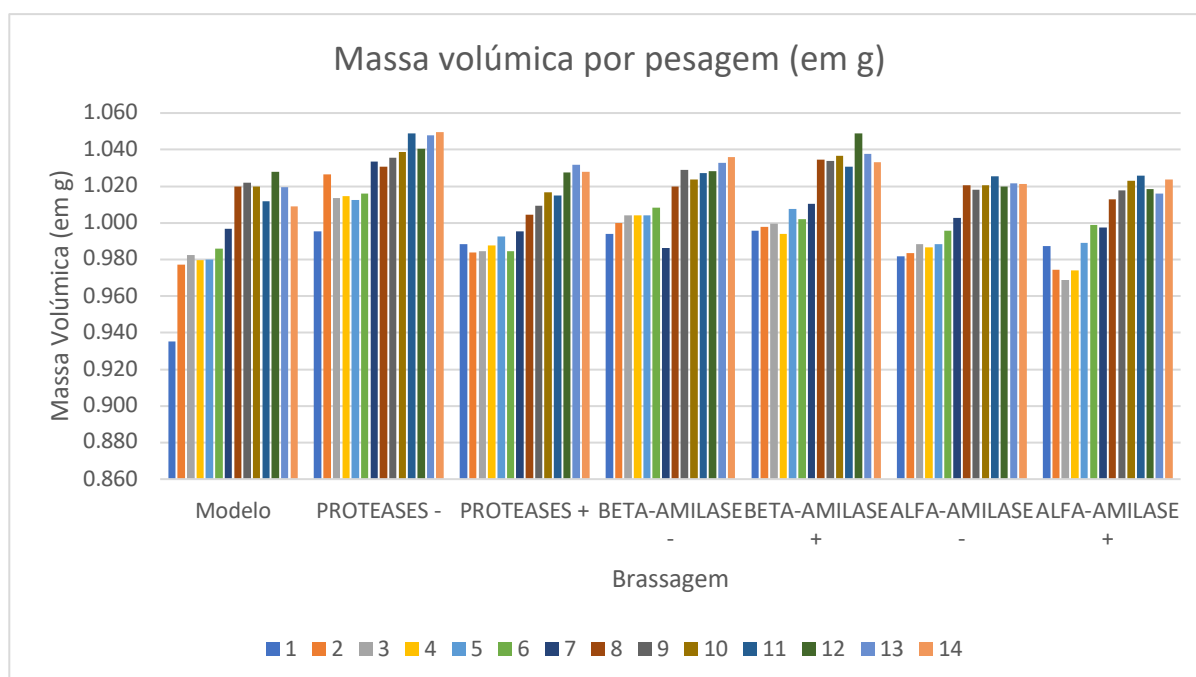


Figura 11 – Massa volúmica em g/mL em cada amostra por cada mosto

4.1.3 Determinação da Proteína total

Outro parâmetro analisado neste ensaio experimental foi a proteína total, mais especificamente a proteína solúvel (Figura 12). Seria expectável que o valor aumentasse da primeira amostra até à quarta amostra devido à solubilização da proteína, diminuindo da quinta para a sexta amostra devido à ação da protease e peptidase, o que não foi observado

visto que o valor aumentou ligeiramente. Esta observação poderá ser explicada pelo fato que somente as proteases estarem ativas, hidrolisando as proteínas a cadeias de polipeptídios, que por sua vez continuam a ser contabilizadas no ensaio. Esta hipótese ganha maior consistência considerando que a temperatura ótima das peptidases está entre os 45°C e os 53°C [15] o que indica que às temperaturas em que se trabalhou (53°C) não é surpreendente que haja uma atividade muito reduzida desta enzima. Os valores de proteína tendem a diminuir partir da sexta amostra provavelmente em resultado da precipitação parcial de algumas destas a temperatura mais elevada.

Em resumo, o valor da proteína total não tem uma variação significativa ao longo da brasagem (Figura 13), se excluirmos a subida da primeira para a segunda amostra devido à solubilização. A partir destes resultados poderá concluir-se que o tempo necessário na etapa dos 54°C poderá ser menor que o utilizado na brassagem padrão. Relativamente às diferentes gamas das temperaturas de ativação da peptidase e protease, é difícil calcular o efeito destas enzimas visto que não terem temperaturas ótimas similares ([37]).

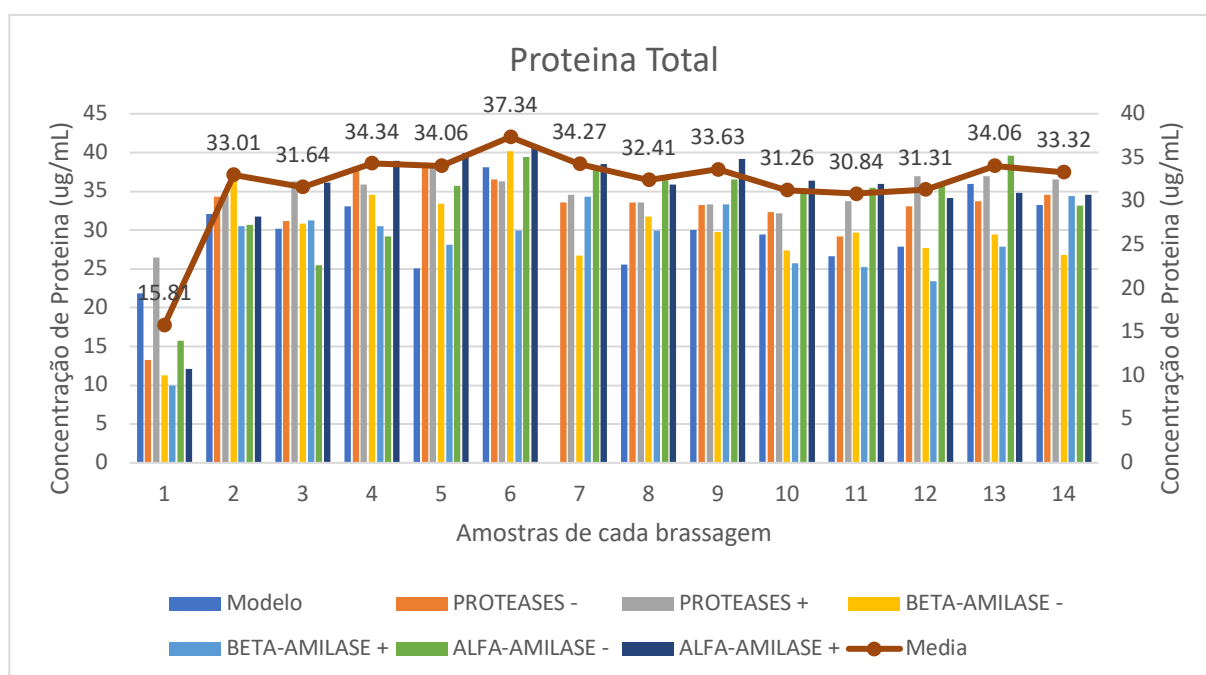


Figura 12 - Proteína total solúvel (em ug/mL) em cada mosto por cada amostras

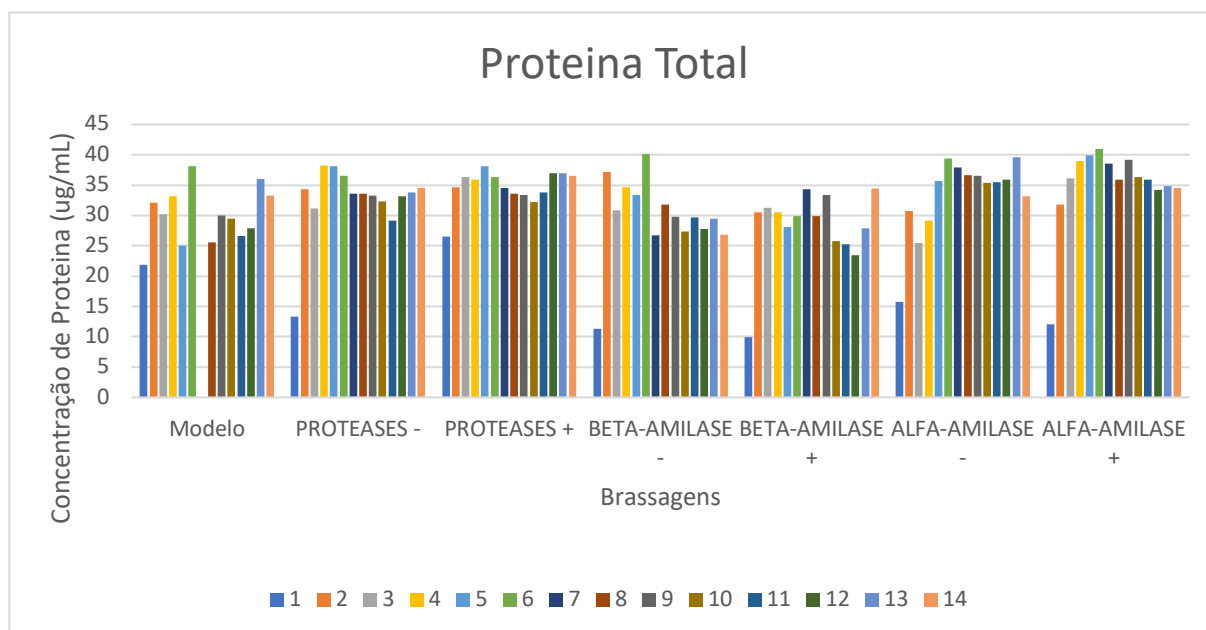


Figura 13 - Proteína total solúvel (em ug/mL) em cada amostra por cada mosto

4.1.4 Determinação da Turvação

A turvação foi determinada com recurso ao espectrofotómetro. Este ensaio consiste na medição da absorvância dos diferentes mostos, na qual o que mais contribui para a turvação são as proteínas não solúveis.

Nos resultados apresentados nos gráficos em baixo (Figura 14 e 15), é de observar que o valor médio obtido das primeiras amostras não tem coerência entre si para as várias brassagens, podendo-se considerar as primeiras amostras como *outliers*. Relativamente aos valores médios da segunda à quinta amostra, os resultados são praticamente iguais (0,23-0,25), sendo que se observa uma ligeira subida da quinta para a sexta amostra, podendo deduzir-se que não há precipitação de proteínas a temperaturas mais baixas. Este evento é seguido por um decréscimo significativo na amostra 7 (0,13) sendo este mais acentuado quando a duração do patamar a 54°C foi maior. Esta ocorrência deve-se ao fato da hidrólise parcial das proteínas por parte da proteases, resultando em péptidos mais solúveis. Os valores médios de absorvância mantêm-se depois praticamente constantes até ao início da ebulição, na qual houve um aumento de absorvância de 0,08 para 0,15. Este resultado está de acordo com o esperado uma vez que no passo 12 houve adição de lúpulo que contribui para precipitar proteínas, tornando os mostos mais turvos. No entanto, o aumento não é significativo, pois o mosto sofreu anteriormente o processo de batch-sparge, isto é, adicionou-se água antes de começar a ebulição, levando a uma diminuição generalizada da concentração dos compostos presentes ([45]).

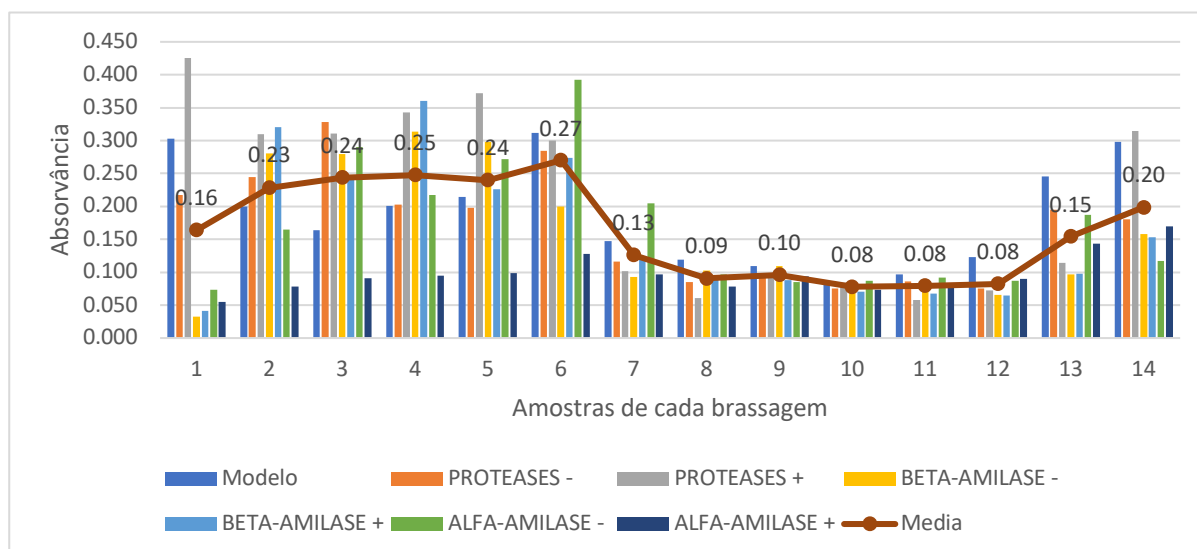


Figura 15 – Medições da turvação em cada mosto por cada amostras

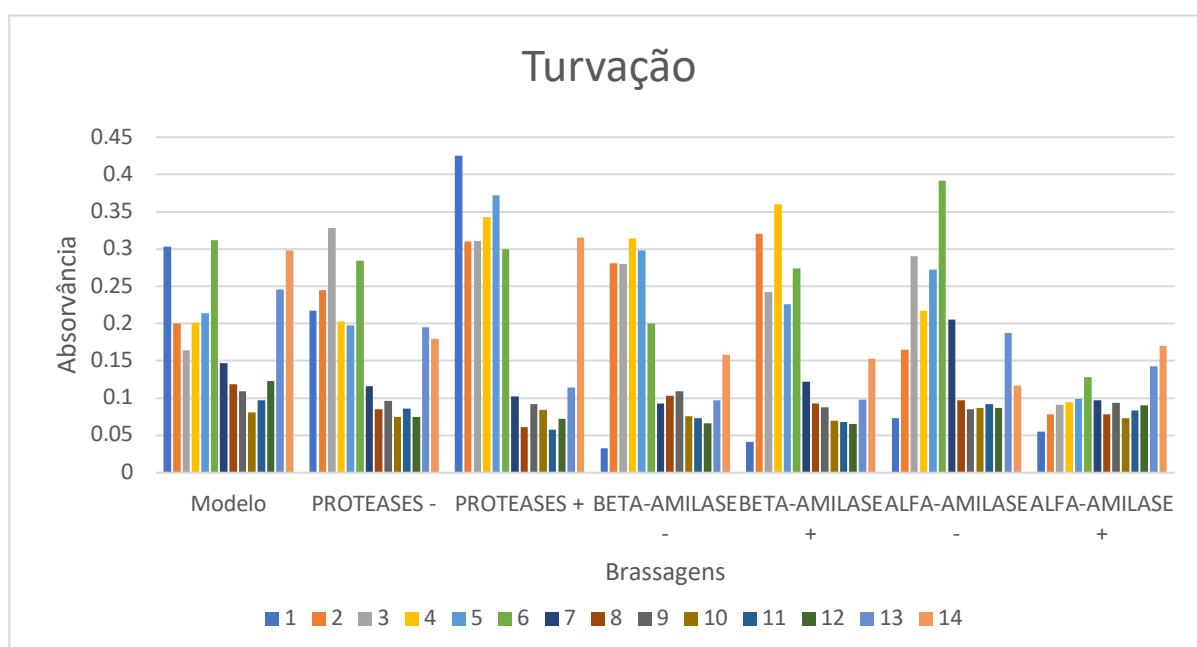


Figura 14 - Medições da turvação em cada amostra por cada mosto

4.2 Caracterização do perfil do mosto em relação aos açúcares e amido após a brassagem

4.2.1 Variação dos açúcares, glucose e ácidos orgânicos (HPLC)

Os valores dos ensaios experimentais para a concentração dos açúcares e ácidos orgânicos encontram-se para cada brassagem dentro do esperado, sendo a maltose o açúcar mais abundante, seguido da maltotriose e da glucose (Figura 16 e 17).

Uma vez que os perfis de tempo/temperatura estão relacionados com a ação enzimática, é expectável que a alteração deste binómio provoque modificações ao nível do

perfil de açúcares do mosto. Comparando os resultados entre brassagens com patamares mais curtos e mais longos com os resultados da brassagem modelo, os valores obtidos foram, no entanto, diferentes do que à partida estaríamos à espera, com valores de açúcares fermentescíveis menores na brassagem modelo face às outras brassagens em que o tempo do patamar correspondente às temperaturas para a β -amilase e α -amilase foi mais curto. Nesta situação seria de esperar que as concentrações da maltose, glucose e maltotriose do mosto modelo estivessem entre os valores das “ α -amilase-” e “ α -amilase+”, bem como as concentrações de maltose do mosto modelo estivessem entre as concentrações do mesmo açúcar dos mostos “ β -amilase-” e “ β -amilase+”. Apesar disso, comparando entre si os resultados das brassagens com um patamar mais curto e mais longo, os resultados relativos são consistentes com o esperado, sendo possível observar a alteração do perfil de açúcares do mosto nas amostras recolhidas no final de cada patamar (amostra 8 e amostra 10) quando o patamar de temperatura correspondente a cada enzima amilolítica é mais longo (brassagem 9 e brassagem 11) (Figuras 16, 17 e 18).

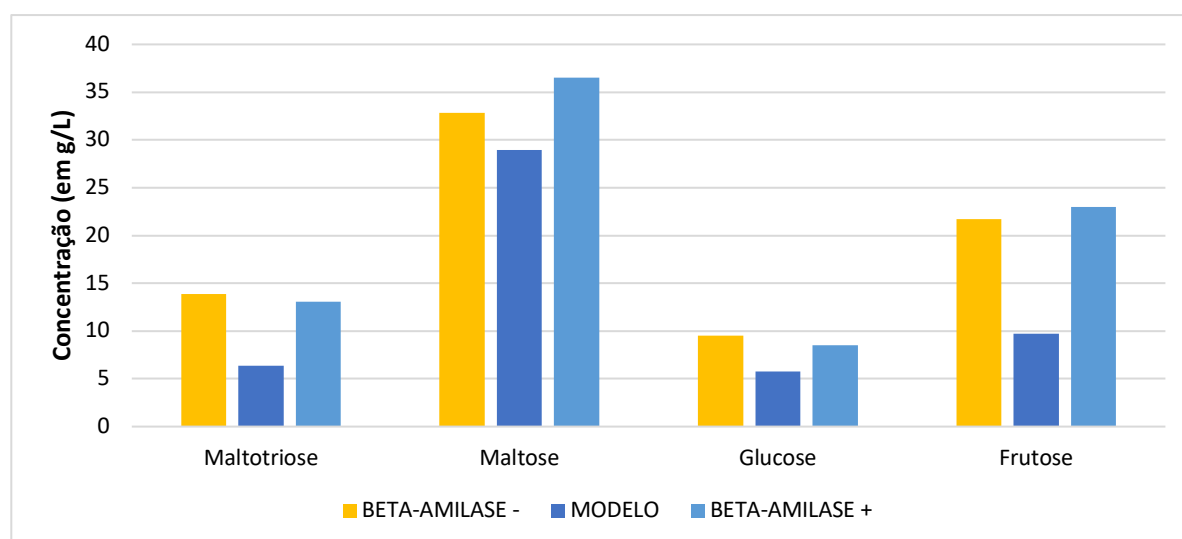


Figura 16 - Concentrações (em g/L) de maltotriose, maltose, glucose e frutose para o mosto modelo, β -amilase - e β -amilase +

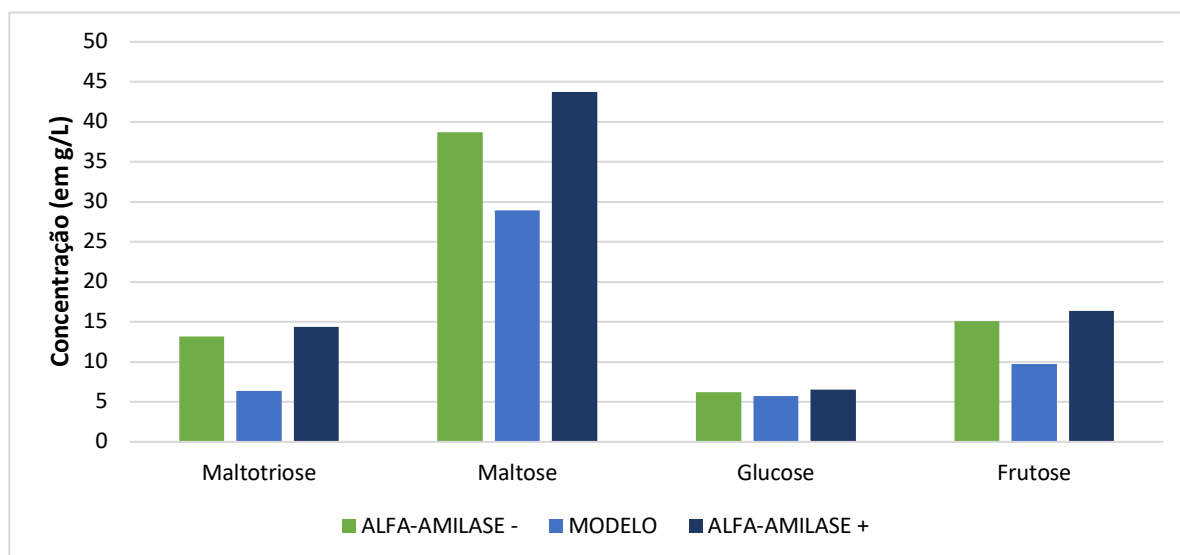


Figura 17 - Concentrações (g/L) de maltotriose, maltose, glucose e frutose para o mosto modelo, α -amilase - e α -amilase +

Em termos de concentração, observa-se que a concentração de maltose é maior no mosto “ α -amilase+”, com uma concentração de 43,73 mg/100mL que no mosto “ β -amilase+”. Isto deve-se ao fato de este mosto corresponder a um maior período de tempo no qual temos a ação das duas enzimas amilolíticas, a β -amilase que origina apenas maltose e a α -amilase que pode originar também maltose para além de outros açúcares como a maltotriose ou a glucose. O segundo mosto com a maior concentração de maltose foi a “ α -amilase-”, com 38,27 mg/100mL. Como este mosto sofreu durante menos tempo a ativação da α -amilase, deduz-se que maior parte desta concentração é devido à ativação da β -amilase.

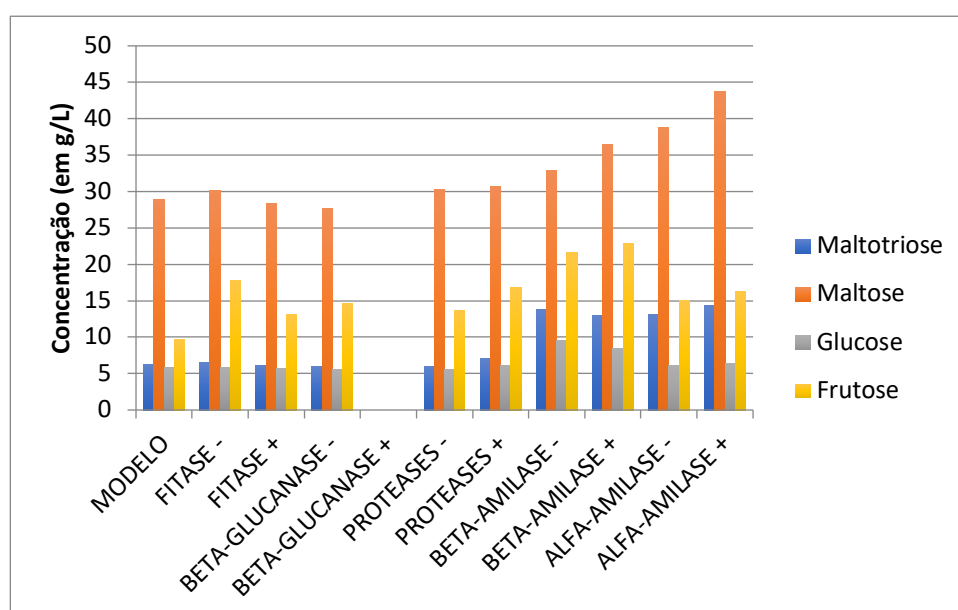


Figura 18 - Concentrações (em g/L) obtidas de maltotriose, maltose, glucose e frutose obtidas em cada mosto

Uma observação a realçar são as concentrações de maltotriose e glucose obtidas a 63°C e a 71°C. Comparando os resultados, verifica-se que, tal como esperado, as

concentrações destes dois açúcares são mais elevadas para os patamares mais longos a 71°C (6,5 g/L vs. 6,2 g/L para a glucose e 14,4 g/L vs. 13,2 g/L para a maltotriose) e mais elevadas para patamares mais curtos a 63°C (9,5 g/L vs. 8,5 g/L para a glucose e 13,9 g/L vs. 13,1 g/L para a maltotriose). Estes resultados refletem a ação das duas enzimas, ou seja onde terá mais atividade a α -amilase, temos maiores teores de maltotriose e glucose e onde tem mais atividade a β -amilase, temos menores teores destes açúcares, uma vez que a maior parte do amido já foi hidrolisada a maltose no patamar anterior e existe uma menor concentração média de amido no mosto para a α -amilase.

Relativamente aos mostos com diferentes durações às temperaturas ótimas das restantes enzimas, inferiores 63°C e 71°C, é possível observar que o conteúdo de açúcares não apresenta diferenças relevantes entre as várias brassagens, sendo este resultado expectável dado que a estas temperaturas a atividade das enzimas amilolíticas é menor.

4.2.2 Variação da Concentração média de amido

O amido é um polímero de glucoses e que pode estar presente em duas formas: Amilose e Amilopectina. Este polímero encontra-se no endosperma do grão e durante a brassagem é convertido pelas α -amilase e β -amilase em açúcares fermentáveis e não fermentáveis.

Como se pode ver na figura 19, a concentração média de amido na brassagem “ α -amilase+” é significativamente superior à das brassagens “Modelo” e “ α -amilase-”. Outro aspeto a referir é a diminuição da concentração média de amido entre a primeira e sexta amostra e de seguida aumentar até à décima quarta amostra. Uma hipótese para este resultado pode residir na combinação entre a solubilização do amido e a atividade das enzimas. Isto é, as enzimas nas primeiras amostras já estão ativas e desnaturam o amido, no entanto o amido não está todo solubilizado e, por conseguinte, há redução observável da concentração por hidrólise sem haver em simultâneo um aumento devido à solubilização. Ao prosseguir com a brassagem, o amido presente está mais solúvel aumentando a sua concentração, no entanto as enzimas na fase final (amostra 11) já não estão ativas o que se reflete numa concentração media elevada de amido. No final da brassagem tem-se o valor mais elevado de amido devido à ebulição.

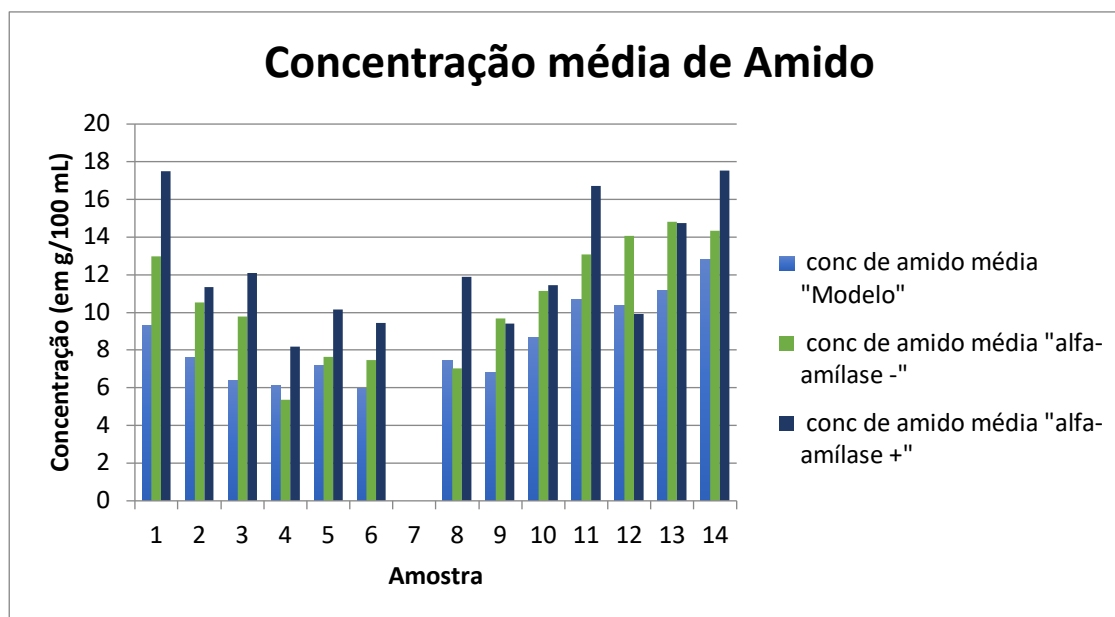


Figura 20 – Concentrações de Amido nas brassagens "Modelo", " α -amilase+" e " α -amilase–" (em g/100mL)

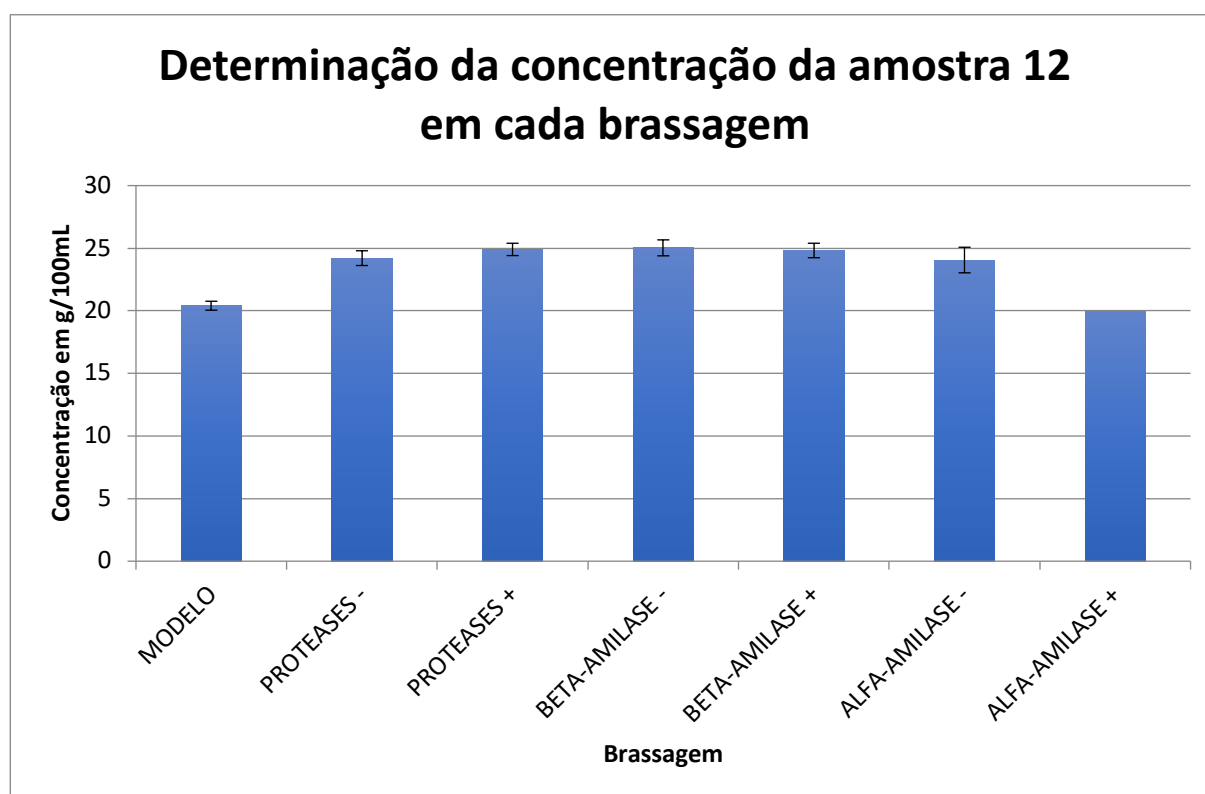


Figura 19 – Concentrações de amido na amostra 12 em cada brassagem (em g/100 mL)

Em relação à figura 20, é possível constatar que a brassagem "Modelo" e " α -amilase+" têm a menor Concentração média de amido no mosto, com 20,40 g/100mL e 19,93 g/100mL respectivamente. Estas são seguidas pelas brassagens " α -amilase –", "peptidase e protéase –" e " β -amilase +" com respectivamente 24,05 g/100mL, 24,2 g/100mL, 24,82 g/100mL. As brassagens com maior teor de amido foram "protéase e petidase +" e " β -amilase –", com 24,9

e 25,03 g/100mL respectivamente. Estes resultados estão relacionados com o estado de conservação do grão maltado utilizado nesta dissertação.

Pela figura 21 é possível determinar a atividade amilolítica em cada amostra nas brassagens “Modelo”, “ α -Amilase –” e “ α -Amilase +” no banho a 64°C. Pelos resultados obtidos, é possível observar que nas primeiras quatro amostras o mosto “ α -Amilase –” demonstra uma atividade quatro vezes maior que os outros dois mostos. Esta discrepância nos valores entre os mostos “ α -Amilase –” e “ α -Amilase +” pode ser explicada pela degradação parcial das enzimas durante o armazenamento do grão utilizado para produzir o mosto “ α -Amilase +”. Na quinta amostra, os valores de atividade dos mostos “modelo” e “ α -Amilase +” aumentaram, enquanto que o valor da “ α -Amilase –” diminuiu. Da sexta até à oitava amostra os valores aumentaram para atividades a rondar os 6,3 e 8,14 mmol/min. A partir deste ponto, a atividade do mosto “ α -Amilase +” diminuiu substancialmente enquanto que para os outros dois mostos a atividade só diminuem na 11ª amostra. A partir deste ponto, pode-se considerar que a atividade em todos os mostos é nula.

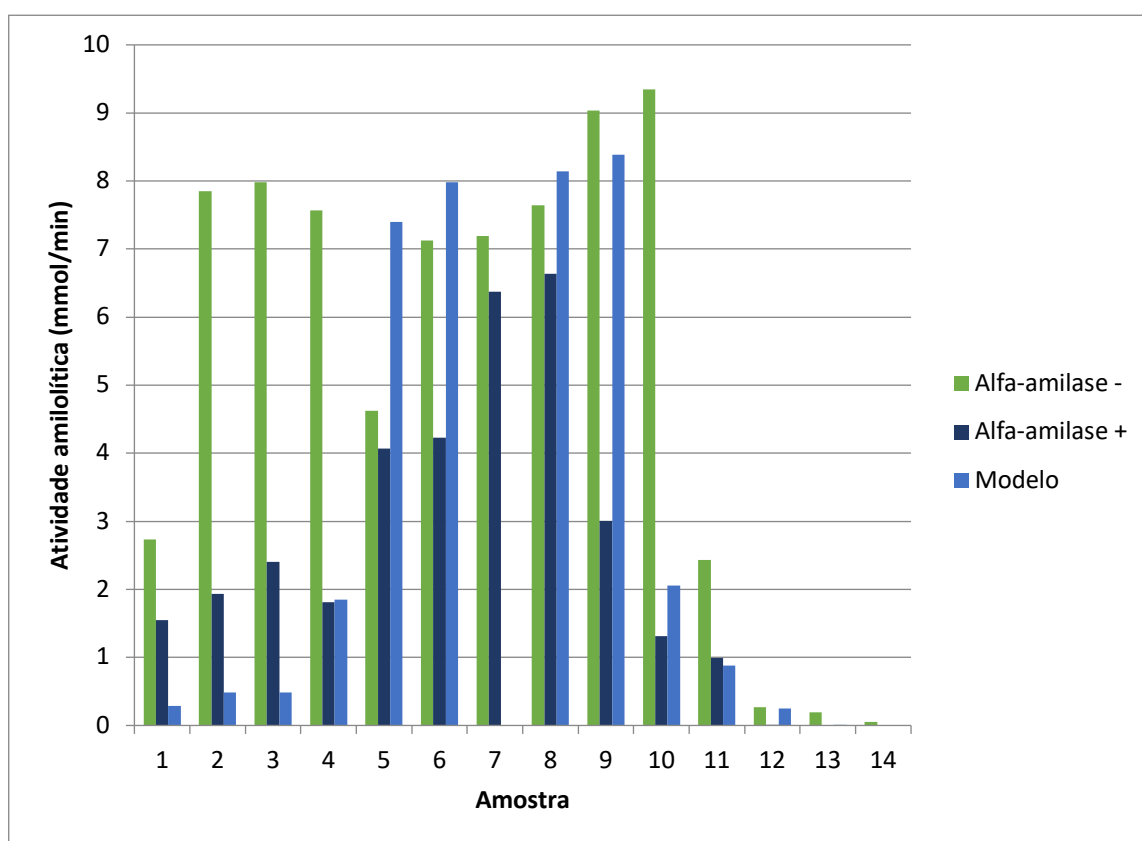


Figura 21 - Atividade nas brassagens Modelo, α -amilase - e α -amilase + (em mmol/min)

5 Conclusões Gerais e Perspetivas Futuras

Devido ao crescimento de procura de cervejas artesanais, é fulcral para cervejeiros desenvolverem diferentes tipos de cerveja. Uma das formas de conseguir este objetivo é a diferenciação no método de produção de cerveja, nomeadamente na produção do mosto. Nesta etapa, cervejeiros têm a oportunidade de criar as condições ideais para as enzimas, de modo que seja possível a produção eficiente de diferentes compostos e assim alterar o perfil de açúcares fermentáveis e a viscosidade do mosto. As enzimas mais importantes nesta dissertação são a α -amilase e a β -amilase, que tem a função converter o amido em açúcares fermentáveis e não-fermentáveis. O presente trabalho não só analisa a atividade amilolítica destas duas enzimas, como também se analisa o efeito da fitase, β -glucanase, peptidase e protéase no mosto, através da realização de onze produções de mostos com diferentes modelos de brassagem em que se variou a duração do patamar a cada temperatura.

Ao longo do processo de produção mosto foram efetuadas várias análises, de forma a fazer a sua caracterização a nível físico e químico. De modo geral, pode-se considerar que a produção do mosto foi bem-sucedida, uma vez que ocorreu um aumento na densidade durante esta operação. Comparando os diferentes mostos produzidos, é possível observar que não diferem muito em relação ao pH, densidade, turvação e proteína total. No entanto, apresentam diferenças em relação aos açúcares analisados em cada mosto, por exemplo o mosto com um modelo de brassagem que permanece mais tempo na gama de temperaturas de ativação da α -amilase tem mais maltose e é dos que contem menos amido em comparação com as outras brassagens.

Por outro lado, quando se determinou a concentração média de amido, não se observou uma redução desta concentração correspondente ao aumento dos açúcares fermentáveis, uma vez que estes resultados refletem o efeito simultâneo da ação das enzimas amilolíticas e dos fenómenos de solubilização da fração menos solúvel do amido (amilopectina) observado a temperaturas mais altas.

Para além de se variar o perfil do mosto em relação ao teor nos vários açúcares, o perfil do mosto foi também alterado modificando a duração dos patamares de temperatura correspondentes à ação das protéases, observando-se uma diminuição da proteína total que deverá ter correspondência num aumento dos aminoácidos livres, que podem influenciar o perfil final da cerveja em termos de flavor.

Relativamente ao objetivo deste trabalho, pode-se considerar alcançado visto que foi possível determinar em que aspeto os modelos de brassagens influenciam o perfil final do mosto que poderá permitir escolher um modelo de brassagem para obter uma cerveja final

com as características desejadas. Face aos resultados obtidos, esta dissertação pode ser um ponto de partida para se estudar modelos de brassagens de outros tipos de cerveja. No entanto, será aconselhável para futuros ensaios experimentais e de forma a comparar o efeito de diferentes perfis do mosto no perfil final da cerveja, realizar a análise do teor alcoólico e da viscosidade uma vez que estes estão diretamente relacionados com a maior ou menor hidrólise do amido. Por outro lado, a alteração da duração dos patamares a temperaturas mais baixas tem implicações no perfil de aminoácidos do mosto o que poderá levar a alterações do perfil de compostos de aroma (álcoois superiores e ésteres) produzidos maioritariamente durante a fermentação e maturação, sendo por isso interessante realizar também uma análise aos teores de compostos voláteis, que são responsáveis pelo aroma da cerveja, com recurso à análise de “espaço-de-cabeça” por cromatografia gasosa e que deve ser acompanhada por uma análise sensorial com um painel de provadores treinado e não treinado.

6 Bibliografia

- [1] Ministério da Economia e da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas - “Portaria n.o 1/96 de 3 de Janeiro,” *Diário da República*, 2, pp. 320–321.
- [2] W. Hardwick - Handbook of Brewing 2nd ed. F. Priest and G. Stewart. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- [3] F. G. Meussdoerffer - “A Comprehensive History of Beer Brewing”. Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets, 1st ed., H. M. Eßlinger, Ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009, pp. 1–36.
- [4] I. S. Hornsey- A History of Beer and Brewing. Cambridge: 2003.
- [5] J. F. M. Swinnen e E. Poelmans- “The Economics of Beer”. The Economics of Beer, 1st ed. J. F. M. Swinnen. New York: Oxford University Press, 2011, pp. 44–105.
- [6] D. E. Briggs, P. A. Brookes, R. Stevens, e C. A. Boulton - Brewing: Science and Practice 2nd ed. Boca Raton: Woodhead Publisher Limited and CRC Press LLC, 2004.
- [7] Holdings Company Ltd. “Kirin Beer University Report Global Beer Consumption by Country in 2014”. Disponível em:
http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2015/1224_01.html#table3. Acesso em: 1/03/2018 .
- [8] A. Lohonyai. “To Engineer is Human: Worldwide Beer Production and Consumption”. Disponível em: <http://alohonyai.blogspot.pt/2013/09/worldwide-beer-production-and.html>. Acesso em: 1/03/2018.
- [9] W. W. B. Alliance. “The Brewing Industry’s Global Economic Impact June 2014”. Disponível em:
http://www.worldwidebrewingalliance.org/docs/Brewing_World_Economic_Impact_2012-2013_website_2.pdf. Acesso em: 1/03/2018 .
- [10] C. Papzian- “Beer Style Guidelines,” Brewers Association. 2015, pp. i–viii.

- [11] Brewers Association- “Beer Styles Study Guide”. [Craftbeer.com](http://craftbeer.com).
- [12] B. Amorim. “As famílias de cerveja : de Ale e Lager.” Disponível em:
<https://papodehomem.com.br/as-familias-de-cerveja-de-ale-e-lager-as-pequenas-hibridas-e-lambics/>. Acesso em: 17/11/2017.
- [13] M. Mosher e K. Trantham – Beer Styles. Brewing Science: A Multidisciplinary Approach. Cham, Suíça: Springer International Publishing, 2017.
- [14] G. Fix - Principles of Brewing Science. 2nd ed. Brewers Publications, 1999.
- [15] M. J. Lewis e T. W. Young - Brewing 2nd ed. 2002, 396 pp.
- [16] Beer Smith. “Brewing Water – Hard or Soft?”. Disponível em:
<http://beersmith.com/blog/2008/08/24/brewing-water-hard-or-soft/>. Acesso em:
16/11/2017.
- [17] M. Conant 2013. *Brewing Water*. Apresentação Power Point. 37 pp.
- [18] D. Schultz 2005. *Water Chemistry in Brewing*. Relatório.
- [19] T. O’Rourke - Technical summary 8: The role of pH in brewing. *The Brewer International*. Vol: 2, 2002, pp. 21–23.
- [20] F. M. Dehrmann e A. Cameron 2011. *The Importance of Water and Water Quality in Brewing*. Apresentação Power Point. Johannesburg.
- [21] P. Schwarz e R. Horsley. *Importance of Quality Grain to Produce Quality Malt*. Apresentação Power Point. Fargo.
- [22] K. J. Kuehl 2014. *Malt & The Malting Process*. Apresentação Power Point.
- [23] Michael. What is Malt?. *A Perfect Pint*. MDA Creative Projects LLC, 612.724.4514, pp. 1–6.
- [24] The Brew Enthusiast. Hops .Disponível em:
<https://www.thebrewenthusiast.com/hops/>. Acesso em: 1/02/2018 .
- [25] M. Verzele e D. De Keukeleire 1991. Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter

Acids, 316–329 pp.

- [26] J. Ratliff. Hops 101. Disponível em: <https://www.mrbeer.com/blog/hops-101/>. Acesso em: 14/03/2018 .
- [27] G. G. Stewart. *Saccharomyces species in the Production of Beer*. Relatório. Edinburgo 2016.
- [28] C. Bamforth - Grape vs. Grain A Historical, Technological, and Social Comparison of Wine and Beer. Cambridge: 2008, 224 pp.
- [29] Barth-Haas Group, Flavor Act, Kerry Bio-Science, and CRC Press - Brewing: New technologies. Cambridge: 2006, 1–484 pp.
- [30] The Brewing Industry Research Foundation - Barley and Malt. Redhill: 1962.
- [31] CHEMISTRY GLOSSARY. Starch. Disponível em: <https://www.periodni.com/gallery/starch.png>. Acesso em: 11/05/2018 .
- [32] E. Pires e T. Brányik - Biochemistry of Beer Fermentation. Springer, 2015.
- [33] T. O'Rourke - Technical summary: The function of enzymes in brewing. The Brewer International. 2, 9pp. 14–18, 2002,
- [34] M. Sammarino - Enzymes in Brewing Series Part 2- Mashing. PRO Tech Notes. 2, 5, 2013, pp. 1–11.
- [35] David J. Maradyn. *Enzyme Use in Beverage Production*. Apresentação Power Point. Franklinton.
- [36] L. J. Denault, P. R. Glenister, e S. Chau - Enzymology of the Mashing Step During Beer Production. ASBC Journal. 1981, pp. 46–52.
- [37] P. N. Campbell - Enzymes in Industry. 2nd ed. Weinheim: W. Aehle, 2004.
- [38] Wiley-Blackwell - Enzymes in Food Technology. 2nd ed. R. J. Whitehurst and M. Van Oort, 2010, 372 pg.
- [39] R. Muller. *A mathematical model of the formation of fermentable sugars from starch*

hydrolysis during high-temperature mashing. Relatório. Enzyme and Microbial Technology. pp. 337–344.

- [40] M. M. E. Garcia - Produção de cerveja : Utilização de estirpes não- convencionais em co-fermentação com Saccharomyces para potenciação do perfil sensorial de diversos tipos de cerveja. Lisboa: 2018. p. 109. Dissertação de Mestrado
- [41] L. Vieira - Avaliação do papel de uma estirpe de uma levedura não-convencional (Hanseniaspora guilliermondii) na produção de uma cerveja tipo English Beer. Lisboa: 2018. Trabalho final de projeto em Biologia.
- [42] V. M. M. Lobo e M. Araujo - A Qualidade das Águas de Mesa Portuguesas. 1994.
- [43] Braukeiser. Mash pH control. Disponível em:
http://braukaiser.com/wiki/index.php/Mash_pH_control#Bicarbonate_and_Alkalinity.
Acesso em: 20/05/2018 .
- [44] D. Green. The Science of Step Mashing. Disponível em:
<https://byo.com/stories/item/1497-the-science-of-step-mashing>. Acesso em:
11/04/2018.
- [45] F. Kühbeck, W. Back, M. Krottenthaler, e J. I. Brew - Influence of Lauter Turbidity and Hot Trub on Wort Composition, Fermentation, and Beer Quality. Journal of the Institute of Brewing. 112, 2006, pp. 215–221.

7 Anexos

Anexo I – Retas de Calibração de HPLC

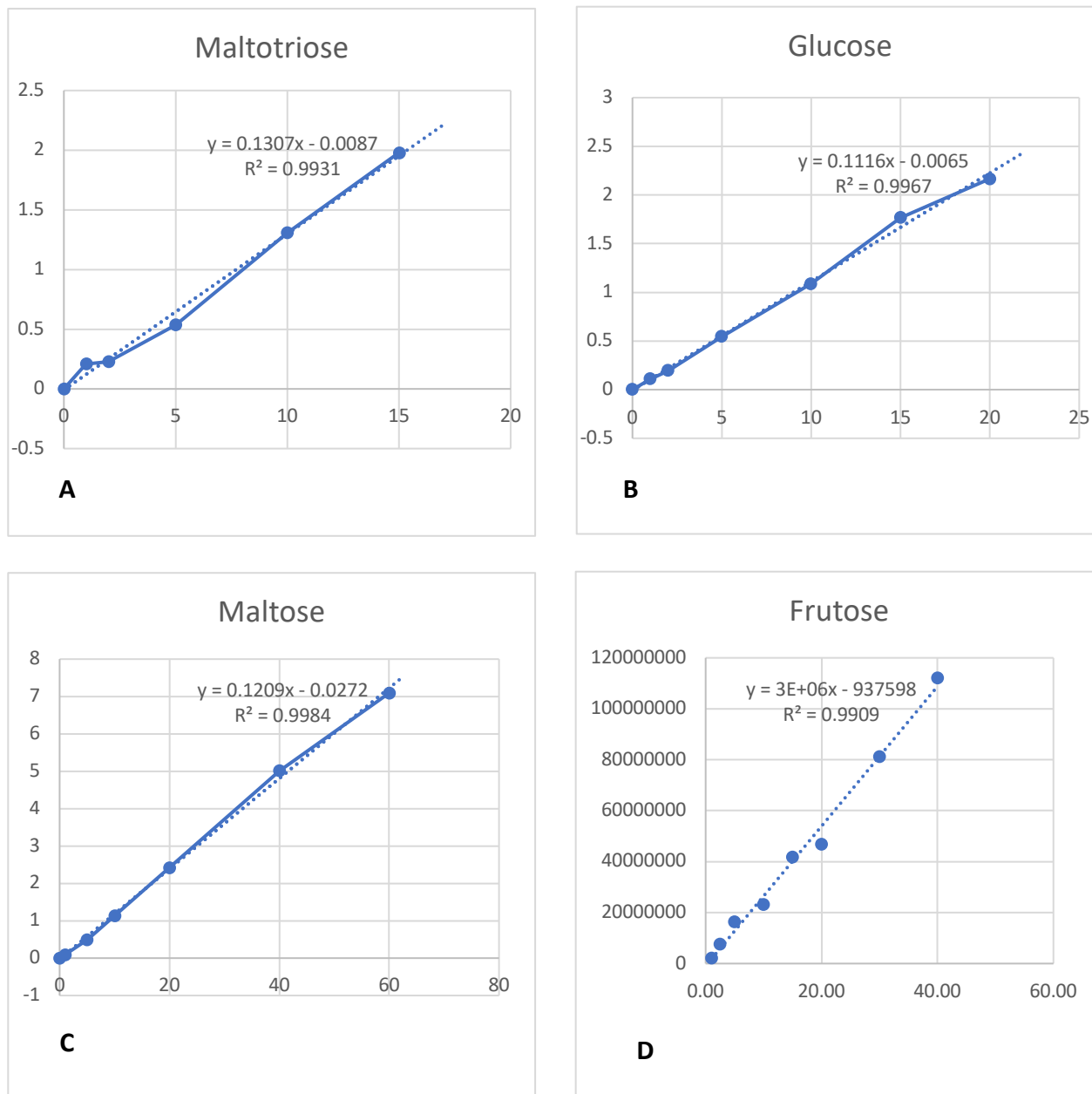


Figura 22 – Curvas de Calibração de HPLC, dos diferentes açúcares – Maltotriose (A), Glucose (B), Maltose (C) e Frutose (D)

Anexo II – Reta de Calibração da Proteína

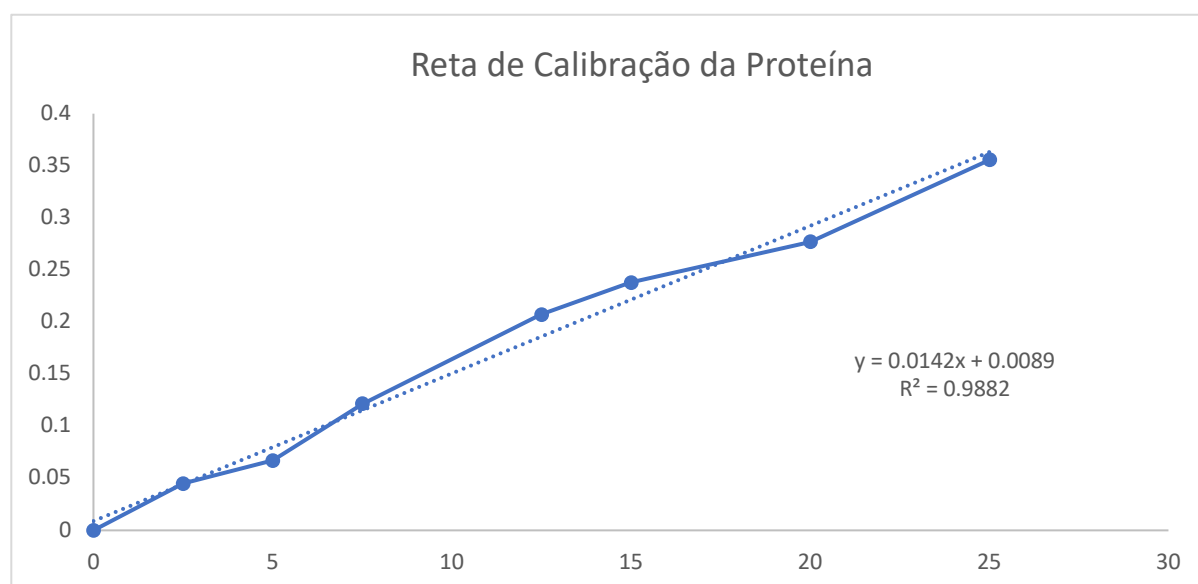


Figura 23 - Curvas de Calibração da Proteína

Anexo III – Reta de Calibração do Amido

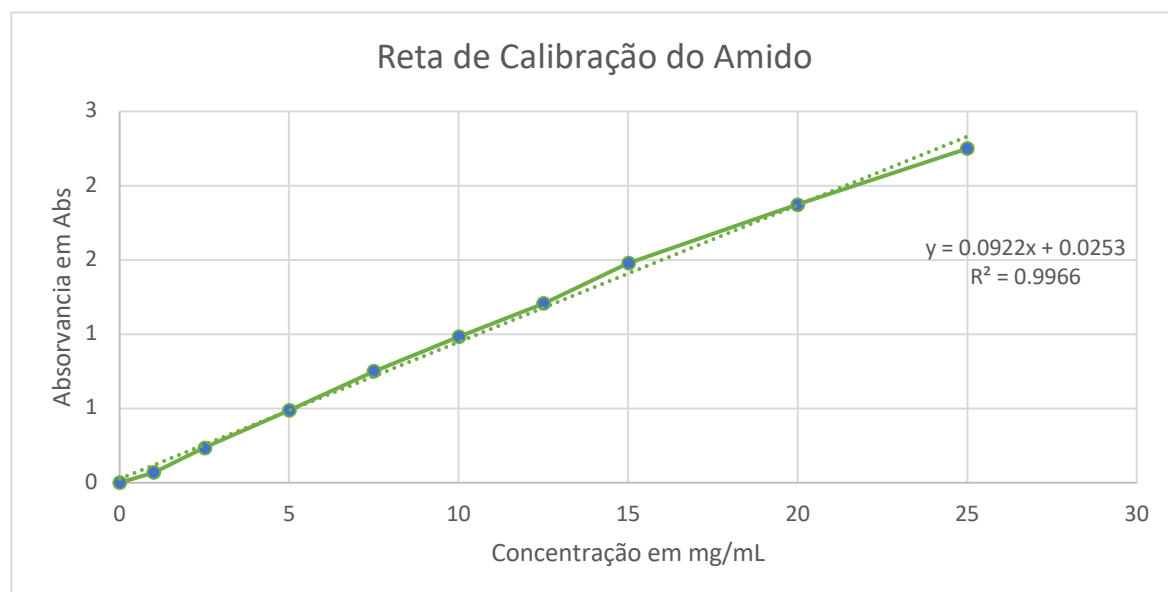


Figura 24 - Curva de Calibração do Amido

Anexo IV – Resultados obtidos nos ensaios experimentais

Tabela 6 – Concentrações de açúcares obtidas por HPLC (em mg/100 mL)

MOSTO	HPLC			
	Açúcar (g/L)			
	Maltotriose	Maltose	Glucose	Frutose
MODELO	6,372	28,974	5,772	9,724
FITASE -	6,651	30,226	5,923	17,825
FITASE +	6,246	28,398	5,778	13,248
BETA-GLUCANASE -	6,037	27,726	5,699	14,737
BETA-GLUCANASE +	-	-	-	-
PROTEASES -	6,108	30,286	5,628	13,815
PROTEASES +	7,215	30,769	6,183	16,944
BETA-AMILASE -	13,886	32,865	9,510	21,722
BETA-AMILASE +	13,053	36,506	8,538	22,961
ALFA-AMILASE -	13,146	38,729	6,245	15,057
ALFA-AMILASE +	14,396	43,732	6,506	16,358

Tabela 7 - Concentração média de amido

Mosto	Concentração média de amido da amostra recolhida em % (m/v)
MODELO	20,4065799
PROTEASES -	24,2045647
PROTEASES +	24,9016105
BETA-AMILASE -	25,0252938
BETA-AMILASE +	24,8168353
ALFA-AMILASE -	24,0533611
ALFA-AMILASE +	19,926669

Tabela 8 - Concentração média de amido para o mosto "Modelo", "alfa-amilase -" e "alfa-amilase +" em g/100mL

Concentração médio de Amido (em g/mL)			
Ponto de amostragem	MOSTO		
	"Modelo"	"alfa-amilase -"	"alfa-amilase +"
1	9,349	12,966	17,497
2	7,627	10,539	11,358
3	6,429	9,794	12,085
4	6,155	5,355	8,191
5	7,210	7,641	10,165
6	5,968	7,484	9,449
7	-	-	-
8	7,495	7,017	11,901
9	6,855	9,696	9,406
10	8,688	11,158	11,445
11	10,716	13,080	16,705
12	10,407	14,053	9,927
13	11,160	14,823	14,742
14	12,833	14,324	17,540

Tabela 9 - Atividade amilolítica aos 63°C (em mmol/min)

Atividade (em mmol de amido/min)			
AMOSTRAS	MOSTOS		
	ALFA-AMILASE -	ALFA-AMILASE +	MODELO
1	2,733	1,548	0,288
2	7,847	1,935	0,489
3	7,982	2,402	0,482
4	7,565	1,811	1,850
5	4,626	4,072	7,402
6	7,125	4,230	7,982
7	7,191	6,377	-
8	7,646	6,637	8,140
9	9,034	3,004	8,384
10	9,343	1,315	2,059
11	2,434	0,994	0,882
12	0,264	0,001	0,251
13	0,197	0,000	0,005
14	0,053	0,000	0,000

Tabela 10 – Valores de pH obtidos para as várias amostras recolhidas ao longo das brassagens

pH														
MOSTO	Amostras													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
MODELO	5,8	5,6	5,5	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,2	5,3
PROTEASES -	5,8	5,7	5,7	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,6
PROTEASES +	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,7	5,7
BETA-AMILASE -	5,9	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,6
BETA-AMILASE +	6,1	5,7	5,7	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,7	5,7	5,6
ALFA-AMILASE -	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,8	5,8	5,7	5,8	5,7	5,7	5,6
ALFA-AMILASE +	5,8	5,7	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,6
MÉDIA	5,8	5,7	5,7	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,7	5,7	5,6

Tabela 11 - massa optica do mosto

Massa volúmica (em g)														
MOSTO	Amostras													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
MODELO	0,9352	0,9773	0,9824	0,9796	0,9798	0,9859	0,9968	1,0198	1,0218	1,0197	1,0120	1,0280	1,0196	1,0091
PROTEASES -	0,9953	1,0264	1,0136	1,0145	1,0126	1,0160	1,0336	1,0305	1,0354	1,0388	1,0489	1,0406	1,0478	1,0497
PROTEASES +	0,9883	0,9839	0,9844	0,9877	0,9927	0,9846	0,9955	1,0045	1,0095	1,0169	1,0151	1,0275	1,0317	1,0279
BETA-AMILASE -	0,9941	0,9998	1,0041	1,0041	1,0040	1,0084	0,9861	1,0198	1,0291	1,0237	1,0271	1,0284	1,0329	1,0360
BETA-AMILASE +	0,9957	0,9979	0,9995	0,9940	1,0077	1,0021	1,0103	1,0344	1,0340	1,0367	1,0305	1,0487	1,0376	1,0330
ALFA-AMILASE -	0,9816	0,9835	0,9883	0,9866	0,9883	0,9957	1,0028	1,0205	1,0181	1,0206	1,0253	1,0200	1,0215	1,0214
ALFA-AMILASE +	0,9872	0,9745	0,9689	0,9741	0,9891	0,9989	0,9973	1,0129	1,0179	1,0231	1,0260	1,0185	1,0161	1,0236
MÉDIA	0,9825	0,9919	0,9916	0,9915	0,9963	0,9988	1,0032	1,0203	1,0237	1,0256	1,0264	1,0302	1,0296	1,0287

Tabela 12 – Valores de densidade obtidos para as várias amostras recolhidas ao longo das brassagens

Densidade														
Mosto	Amostras													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
MODELO	1,005	1,006	1,006	1,007	1,009	1,013	1,019	1,041	1,043	1,049	1,050	1,052	1,047	1,051
FITASE -	1,001	1,006	1,007	1,009	1,010	1,014	1,020	1,041	1,043	1,053	1,052	1,052	1,050	1,052
FITASE +	1,000	1,006	1,008	1,010	1,014	1,018	1,020	1,044	1,045	1,053	1,054	1,056	1,050	1,055
BETA-GLUCANASE -	1,002	1,006	1,008	1,010	1,012	1,018	1,024	1,043	1,044	1,051	1,054	1,050	1,050	1,054
BETA-GLUCANASE +	1,001	1,006	1,007	1,011	1,013	1,020	1,022	1,045	1,046	1,054	1,055	1,056	1,050	1,053
PROTEASES -	1,000	1,006	1,008	1,011	1,012	1,016	1,020	1,043	1,045	1,052	1,054	1,056	1,050	1,056
PROTEASES +	1,006	1,008	1,010	1,012	1,013	1,020	1,023	1,045	1,047	1,054	1,056	1,058	1,052	1,055
BETA-AMILASE -	1,000	1,006	1,008	1,011	1,012	1,016	1,022	1,038	1,042	1,050	1,051	1,054	1,049	1,053
BETA-AMILASE +	0,998	1,005	1,006	1,009	1,010	1,015	1,018	1,044	1,045	1,050	1,053	1,053	1,051	1,053
ALFA-AMILASE -	1,000	1,007	1,009	1,010	1,012	1,020	1,022	1,044	1,046	1,050	1,051	1,054	1,052	1,055
ALFA-AMILASE +	1,000	1,006	1,007	1,010	1,012	1,020	1,020	1,043	1,045	1,054	1,055	1,055	1,050	1,053
Media	1,001	1,006	1,007	1,010	1,012	1,017	1,021	1,043	1,045	1,052	1,053	1,054	1,050	1,054

Tabela 13 – Valores de proteína total do mosto (em $\mu\text{g/mL}$) obtidos para as várias amostras recolhidas ao longo das brassagens

Proteína Total (em $\mu\text{g/mL}$)														
MOSTO	Amostras													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
MODELO	21,8	32,0	30,2	33,1	25,1	38,1		25,6	30,0	29,4	26,6	27,9	36,0	33,2
PROTEASES -	13,3	34,3	31,2	38,2	38,1	36,6	33,6	33,6	33,2	32,3	29,2	33,1	33,7	34,5
PROTEASES +	26,5	34,6	36,3	35,9	38,1	36,3	34,5	33,5	33,3	32,2	33,7	36,9	36,9	36,6
BETA-AMILASE -	11,3	37,1	30,8	34,6	33,4	40,2	26,8	31,8	29,8	27,4	29,7	27,7	29,4	26,8
BETA-AMILASE +	10,0	30,5	31,3	30,5	28,1	29,9	34,3	29,9	33,3	25,8	25,3	23,4	27,9	34,4
ALFA-AMILASE -	15,7	30,7	25,5	29,2	35,7	39,4	37,9	36,6	36,6	35,4	35,4	35,9	39,6	33,2
ALFA-AMILASE +	12,1	31,8	36,1	39,0	39,9	40,9	38,5	35,9	39,2	36,4	35,9	34,2	34,8	34,5
MÉDIA	15,8	33,0	31,6	34,3	34,1	37,3	34,3	32,4	33,6	31,3	30,8	31,3	34,1	33,3

Tabela 14 – Valores de turvação do mosto (em Abs) obtidos para as várias amostras recolhidas ao longo das brassagens

Turvação (em Abs)														
	Amostras													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
MODELO	0,303	0,200	0,164	0,201	0,214	0,312	0,147	0,119	0,109	0,081	0,097	0,123	0,246	0,298
PROTEASES -	0,217	0,245	0,328	0,203	0,198	0,284	0,116	0,085	0,096	0,075	0,086	0,075	0,195	0,180
PROTEASES +	0,425	0,310	0,311	0,343	0,372	0,300	0,102	0,061	0,092	0,084	0,058	0,072	0,114	0,315
BETA-AMILASE -	0,033	0,281	0,280	0,314	0,298	0,200	0,093	0,103	0,109	0,076	0,073	0,066	0,097	0,158
BETA-AMILASE +	0,041	0,320	0,242	0,360	0,226	0,274	0,122	0,093	0,088	0,070	0,068	0,065	0,098	0,153
ALFA-AMILASE -	0,073	0,165	0,290	0,217	0,272	0,392	0,205	0,097	0,085	0,087	0,092	0,087	0,187	0,117
ALFA-AMILASE +	0,055	0,078	0,091	0,095	0,099	0,128	0,097	0,078	0,094	0,073	0,083	0,090	0,143	0,170
MÉDIA	0,164	0,228	0,244	0,248	0,240	0,270	0,126	0,091	0,096	0,078	0,080	0,083	0,154	0,199